



**Nuno André Fraga de  
Almeida**

**Efeito da ceramização na reactividade superficial  
de vidros de Ca-P-Mg-Si**



**Nuno André Fraga de  
Almeida**

**Efeito da ceramização na reactividade superficial  
de vidros de Ca-P-Mg-Si**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, realizada sob a orientação científica da Dra. Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

Doutor Vítor Brás de Sequeira Amaral, Professor Associado da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Ascensão Ferreira da Silva Lopes, Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Doutor José Martinho Marques Oliveira, Professor Adjunto da Escola Aveiro Norte – Rede de Unidades de Formação Especializada, da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Helena Vaz Fernandes, Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientadora)

Dedico este trabalho a tudo o que nos causa saudade



## **agradecimentos**

Queria deixar expresso o meu especial agradecimento à Doutora Maria Helena Vaz Fernandes pelo seu apoio, pela sua cultura científica e pelo seu inegável sentido humano.

A todos os presentes no laboratório de biomateriais pela sua amizade e ajuda durante a elaboração deste trabalho. Um especial agradecimento à Barbara, Sandra e Paula que me orientaram nas minhas primeiras lides laboratoriais.

A todos os amigos que fiz durante a minha presença no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro.

A todos os técnicos do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro pela sua ajuda na elaboração deste trabalho.

Ao meu Pai e Irmão por todo o apoio durante toda a minha vida.

E por fim, um especial agradecimento à Carla pela sua inabalável fê em mim.

## palavras-chave

Vidro, vidro cerâmico, bioactividade, apatite

## resumo

A mineralização em meio acelular de vidros e vidros cerâmicos está relacionada com a capacidade de formação de uma camada apatítica à sua superfície. Vidros e vidros cerâmicos apresentam diferenças significativas na formação dessa camada, estando estas intimamente ligadas a diferenças na respectiva reactividade superficial. A reactividade superficial, por sua vez, está relacionada com a taxa de dissolução do vidro e com a natureza e quantidade de fases cristalinas presentes no vidro cerâmico. Neste trabalho estudou-se o comportamento de vidros e correspondentes vidros cerâmicos, quando imersos em fluidos fisiológicos sintéticos.

As amostras em estudo foram seleccionadas no sistema  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{SiO}_2$ - $\text{MgO}$  e preparadas a partir de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  e  $\text{MgO}$ . Algumas foram sujeitas a tratamentos térmicos adicionais para obter vidros cerâmicos. Testes de imersão em meio acelular foram realizados, tanto nos vidros como nos vidros cerâmicos, usando a solução de fluido fisiológico sintético de Kokubo (SBF) e tempos de ensaio até 30 dias.

A análise por DRX evidenciou a natureza amorfa do vidro enquanto que os vidros cerâmicos apresentam adicionalmente duas fases cristalinas distintas, um fosfato de cálcio e magnésio e um silicato de magnésio. A observação da microestrutura por microscopia electrónica de varrimento (SEM) permitiu distinguir claramente as fases cristalinas da fase amorfa, e diferenciar com alguma dificuldade as fases cristalinas entre si. A observação em SEM com espectroscopia de dispersão de energia das amostras após imersão em SBF permitiu identificar uma camada apatítica sobre as suas superfícies, rapidamente formada no vidro e mais lentamente nos vidros cerâmicos.

A técnica de microscopia electrónica de varrimento constitui uma ferramenta indispensável, quer no acompanhamento do processo de cristalização de vidros quer na avaliação da reactividade superficial dos vidros e vidros cerâmicos, fundamental para a compreensão do processo de mineralização desses materiais.

Procurou-se utilizar a microscopia de força atómica para complementar os estudos *in vitro*; os resultados obtidos sustentaram as observações feitas por SEM.

**keywords**

Glass, glass ceramic, bioactivity, apatite

**abstract**

The mineralization of glasses and glass-ceramics in an acellular medium is related with the ability to form an apatite layer on their surfaces. Glass-ceramics and glasses have significant differences in the formation of this layer due to distinct surface reactivities. The surface reactivity is related with the rate of glass dissolution and with the nature and amount of crystalline phases in the glass-ceramics. In this work the behaviour of glasses and corresponding glass-ceramics in simulated body fluid has been studied. The samples with compositions in the  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$  system were prepared from reagent grade  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  and  $\text{MgO}$ . Some samples were submitted to additional heat treatments to obtain glass-ceramics. Immersion tests in an acellular medium have been carried out using the Kokubo's simulated body fluid (SBF) with incubation times up to 30 days.

XRD analysis confirmed the amorphous nature of the glass while the glass-ceramic exhibited additionally two distinct crystalline phases, a calcium magnesium phosphate and a magnesium silicate. SEM observation of microstructures allowed to distinguish the amorphous phase from the crystalline phases, although these were difficult to differentiate between themselves. SEM and EDS analysis of the samples after immersion in SBF showed an apatite layer on their surfaces, which formed fast on the glass and more slowly on the glass-ceramics.

SEM technique revealed to be a powerful tool to follow the crystallization process of glasses and to evaluate the surface reactivity of glasses and glass-ceramic, essential for the understanding of the mineralization process of these materials.

Atomic Force microscopy was used to complete the in vitro tests, results obtained by this technique confirmed the results obtained in the SEM observations.

# ÍNDICE

<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b> .....	<b>III</b>
---------------------------------------	------------

<b><u>ÍNDICE DE TABELAS</u></b> .....	<b>VI</b>
---------------------------------------	-----------

<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
--------------------------------------	----------

1 INTRODUÇÃO .....	3
2 O OSSO .....	6
3 BIOACTIVIDADE.....	7
4 VIDROS E VIDROS CERÂMICOS .....	12

<b>2 MÉTODOS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS DE ANÁLISE .....</b>	<b>17</b>
--	-----------

1 ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL .....	19
2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	19
3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO, .....	19
4 ESPECTROSCOPIA POR EMISSÃO POR PLASMA INDUTIVO <sup>[81]</sup> .....	20
5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO .....	20
6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA .....	20

6.1.1 Modo de contacto ( <i>contact mode</i> ) .....	23
6.1.2 Modo de não contacto ( <i>taping mode</i> ) .....	25

<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
1	PREPARAÇÃO DOS VIDROS .....	29
2	PREPARAÇÃO DOS VIDROS CERÂMICOS.....	32
2.1	<i>Análise térmica diferencial .....</i>	32
2.2	<i>Tratamentos térmicos de cristalização do vidro V25.....</i>	33
2.3	<i>Tratamentos térmicos de cristalização do vidro V20.....</i>	38
3	ENSAIOS DE BIOACTIVIDADE .....	45
3.1	<i>Vidro V25 .....</i>	45
3.1.1	Vidro cerâmico V25C .....	48
3.1.2	Análise das trocas iônicas entre a solução e o material .....	51
3.1.3	Análise da camada formada.....	53
3.2	<i>Vidro V20 .....</i>	55
3.2.1	Vidro cerâmico V20C-840 .....	57
3.2.2	Vidro cerâmico V20C-870 .....	60
3.2.3	Vidro cerâmico V20C-890 .....	63
3.2.4	Vidro cerâmico V20C-910 .....	65
3.2.5	Análise das trocas iônicas entre a solução e o material .....	68
3.2.6	Análise da camada formada.....	70
3.3	<i>Ensaio de “bioactividade” In situ por AFM.....</i>	72
3.4	<i>Conclusões .....</i>	75
3.5	<i>Trabalhos Futuros.....</i>	77
<b>4</b>	<b>BILIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: BIOACTIVIDADE DE VÁRIOS MATERIAIS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IMPLANTAÇÃO: (A) BIOACTIVIDADE RELATIVA (B) PERCENTAGEM DE TECIDO ÓSSEO INTERFACIAL. <sup>[6]</sup> .....	8
FIGURA 2: ESQUEMA DE UM MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	21
<b>FIGURA 3:</b> DESENHO ESQUEMÁTICO DA SONDA (HASTE + PONTA) E DA AMOSTRA. ....	22
FIGURA 4: CURVA DE FORÇA EM FUNÇÃO (NEWTONS) DA DISTÂNCIA (ANGSTRONS) DA INTERACÇÃO ENTRE A PONTA E A SUPERFÍCIE DA AMOSTRA.....	24
FIGURA 5: IMAGEM EXEMPLIFICATIVA DO MOVIMENTO DA SONDA EM “TAPING MODE”. ....	25
FIGURA 6: DIAGRAMA TERNÁRIO DO SISTEMA 3CaO.P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -SiO <sub>2</sub> -MgO (%WT), COM INDICAÇÃO DA REGIÃO DE FORMAÇÃO DE VIDRO. ....	29
FIGURA 7: DIFRACTOGRAMA DE DRX DOS VIDROS V25 E V20 APÓS A FRITA.....	31
FIGURA 8: ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL DO VIDRO V20 E DO VIDRO V25. ....	32
FIGURA 9: ESQUEMA DO PROGRAMA DE TRATAMENTO TÉRMICO USADO NOS TRATAMENTOS TÉRMICOS AO VIDRO V25 (O MESMO FOI SEGUIDO PARA O VIDRO V20). ....	33
FIGURA 10: DIFRACTOGRAMA DE DRX DO VIDRO V25 APÓS TRATAMENTO TÉRMICO A 980°C .....	35
FIGURA 11: IMAGEM DE SEM DA SUPERFÍCIE POLIDA DE: A) V25 B) V25C. ....	36
FIGURA 12: MAPAS EDS PARA O VIDRO V25C A) Ca E P; B) Si E Mg.....	37
FIGURA 13: IMAGEM DE ELECTRÕES RETRODISPERSADOS DE V25C.....	38
FIGURA 14: DIFRACTOGRAMAS DE DRX DO VIDRO V20 E DOS SEUS VIDROS CERÂMICOS. ....	41
FIGURA 15: DIFRACTOGRAMA DE DRX DO VIDRO CERÂMIZADO A 840 °C COM INDICAÇÃO DAS LINHAS DE BASE UTILIZADAS NO CALCULO DA CRISTALINIDADE.....	42
FIGURA 16: IMAGENS DE ELECTRÕES RETRODISPERSADOS DO VIDRO V20 CRISTALIZADOS A: A) 840 .....	44
FIGURA 17: MAPAS DE EDS PARA V20C-910 A) Ca E P; E B) Si E Mg]. ....	44
FIGURA 18: IMAGEM DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25, COM VÁRIOS TEMPOS DE IMERSÃO EM SBF: .....	46
FIGURA 19: IMAGEM DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25, COM 1 DIA DE IMERSÃO EM SBF,.....	47
FIGURA 20: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25 COM 5 DIAS DE IMERSÃO EM SBF,.....	47
FIGURA 21: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25 COM 7 DIAS DE IMERSÃO EM SBF,.....	47
FIGURA 22: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25C COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	49
FIGURA 23: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25C COM: A) 1 DIA DE IMERSÃO; B) 5 DIAS DE IMERSÃO. ....	49
FIGURA 24: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25C COM: A) 7 DIAS DE IMERSÃO; B) 10 DIAS DE IMERSÃO. ....	49
FIGURA 25: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25C COM 20 DIAS DE IMERSÃO,.....	50
FIGURA 26: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25C COM 30 DIAS DE IMERSÃO,.....	50
FIGURA 27: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V25 CRISTALIZADO COM 5 MESES DE IMERSÃO, .....	50
FIGURA 28: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ELEMENTAR DA SOLUÇÃO DE SBF APÓS IMERSÃO DA AMOSTRA DE VIDRO V25 E VIDRO CERÂMICO V25C .....	52

FIGURA 29: PH DA SOLUÇÃO DE SBF AO FIM DOS VÁRIOS TEMPOS DE IMERSÃO DO VIDRO V25 E V25 CRISTALIZADO. ....	53
FIGURA 30: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO VIDRO V25 APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO E RESPECTIVO VIDRO CERÂMICO APÓS 5 MESES DE IMERSÃO. ....	54
FIGURA 31: DIFRACTOGRAMA DE DRX DO VIDRO V25 APÓS 7 DIAS DE IMERSÃO E RESPECTIVO VIDRO CERÂMICO APÓS 5 MESES DE IMERSÃO. ....	54
FIGURA 32: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V20 COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	55
FIGURA 33: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V20 COM 1 DIA DE IMERSÃO, ....	56
FIGURA 34: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO VIDRO V20 COM: A) 5 DIAS DE IMERSÃO; B) 7 DIAS DE IMERSÃO. ....	56
FIGURA 35: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-840 COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	58
FIGURA 36: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-840 COM: A) 1 DIA DE IMERSÃO; B) 5 DIAS DE IMERSÃO. ....	58
FIGURA 37: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-840 COM: A) 7 DIAS DE IMERSÃO; B) 10 DIAS DE IMERSÃO. ....	58
FIGURA 38: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-840 COM: A) 20 DIAS DE IMERSÃO; B) 30 DIAS DE IMERSÃO. ....	59
FIGURA 39: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-840 COM 5 MESES DE IMERSÃO, ....	59
FIGURA 40: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-870 COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	61
FIGURA 41: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-870 COM: A) 1 DIA DE IMERSÃO; B) 5 DIAS DE IMERSÃO. ....	61
FIGURA 42: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-870 COM: A) 7 DIAS DE IMERSÃO; B) 10 DIAS DE IMERSÃO. ....	61
FIGURA 43: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-870 COM: A) 20 DIAS DE IMERSÃO; B) 30 DIAS DE IMERSÃO. ....	62
FIGURA 44: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-870 COM 5 MESES DE IMERSÃO, ....	62
FIGURA 45: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-890 COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	63
FIGURA 46: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-890 COM: A) 1 DIA DE IMERSÃO; B) 5 DIAS DE IMERSÃO. ....	63
FIGURA 47: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-890 COM: A) 7 DIAS DE IMERSÃO; B) 10 DIAS DE IMERSÃO. ....	64
FIGURA 48: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-890 COM: A) 20 DIAS DE IMERSÃO; B) 30 DIAS DE IMERSÃO. ....	64
FIGURA 49: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-890 COM 5 MESES DE IMERSÃO, ....	64

FIGURA 50: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-910 COM: A) 1 HORA DE IMERSÃO; B) 2 HORAS DE IMERSÃO. ....	65
FIGURA 51: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-910 COM: A) 1 DIA DE IMERSÃO; B) 5 DIAS DE IMERSÃO. ....	66
FIGURA 52: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-910 COM: A) 7 DIAS DE IMERSÃO; B) 10 DIAS DE IMERSÃO. ....	66
FIGURA 53: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-910 COM: A) 20 DIAS DE IMERSÃO; B) 30 DIAS DE IMERSÃO. ....	66
FIGURA 54: IMAGENS DE SEM DA SUPERFÍCIE DO V20C-910 COM 5 MESES DE IMERSÃO, ....	67
FIGURA 55: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CA E P NA SOLUÇÃO DE SBF PARA O VIDRO V20 E PARA OS RESPECTIVOS VIDROS CERÂMICOS. ....	68
FIGURA 56: VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MG E SI DA SOLUÇÃO DE SBF PARA O VIDRO V20 E PARA OS RESPECTIVOS VIDROS CERÂMICOS. ....	68
FIGURA 57: VALORES DE PH DA SOLUÇÃO DE SBF APÓS VÁRIOS TEMPOS DE IMERSÃO DO VIDRO V20 E DOS RESPECTIVOS VIDROS CERÂMICOS. ....	69
FIGURA 58: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO VIDRO V20 COM 7 DIAS DE IMERSÃO E RESPECTIVOS VIDROS CERÂMICOS COM 5 MESES DE IMERSÃO. ....	70
FIGURA 59: DIFRACTOGRAMA DRX DE ÂNGULO RASANTE DO VIDRO V20 COM 7 DIAS DE IMERSÃO E DOS RESPECTIVOS VIDROS CERÂMICOS COM 5 MESES DE IMERSÃO. ....	71
FIGURA 60: IMAGENS DE AFM DO VIDRO V25 COM 30 MINUTOS, 1,5 HORAS, 4 HORAS DE IMERSÃO EM SBF (DA ESQUERDA PARA A DIREITA). ....	73
FIGURA 61: IMAGENS DE AFM DO VIDRO V20 COM 30 MINUTOS, 1,5 HORAS, 4 HORAS DE IMERSÃO EM SBF (DA ESQUERDA PARA A DIREITA). ....	73
FIGURA 62: IMAGENS DE AFM DO VIDRO CERÂMICO V25C COM 30 MINUTOS, 1,5 HORAS, 4 HORAS DE IMERSÃO EM SBF (DA ESQUERDA PARA A DIREITA). ....	74
FIGURA 63: IMAGENS DE AFM DO VIDRO CERÂMICO V20C-840 COM 30 MINUTOS, 1,5 HORAS, 4 HORAS DE IMERSÃO EM SBF (DA ESQUERDA PARA A DIREITA). ....	74
FIGURA 64: IMAGENS DE AFM DO VIDRO CERÂMICO V20C-910 COM 30 MINUTOS, 1,5 HORAS, 4 HORAS DE IMERSÃO EM SBF (DA ESQUERDA PARA A DIREITA). ....	74



## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: TIPOS DE RESPOSTA DOS TECIDOS AO IMPLANTE.....	4
TABELA 2: TIPOS DE LIGAÇÕES DOS BIOMATERIAIS.....	5
TABELA 3: CONCENTRAÇÃO IÔNICA DO PLASMA HUMANO E DO SBF. <sup>[14]</sup> .....	9
<b>TABELA 4:</b> ÍNDICE DE BIOACTIVIDADE ( <i>IN VIVO</i> ), CLASSE DE BIOACTIVIDADE E TIPO DE RESPOSTA CELULAR NUM DEFEITO ÓSSEO DE VÁRIOS BIOMATERIAIS.....	10
TABELA 5: APLICAÇÕES CLÍNICAS DE ALGUMAS MATERIAIS.....	14
TABELA 6: COMPOSIÇÃO DOS VIDROS V25 E V20 (% PESO).....	30
TABELA 7: QUADRO RESUMO DOS RESULTADOS DO TRATAMENTO TÉRMICO AO VIDRO V25 (OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS) .....	34
TABELA 8: QUADRO RESUMO DAS DIFERENTES FASES CRISTALINAS ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS APÓS TRATAMENTO TÉRMICO. ....	34
TABELA 9: PERCENTAGEM MOLAR TEÓRICA DAS DIFERENTES FASES DE FOSFATO DE CÁLCIO ENCONTRADAS NOS VIDROS CERAMIZADOS A PARTIR DO VIDRO V25.....	35
TABELA 10: TABELA RESUMO DA COMPOSIÇÃO NOMINAL ATÔMICA DETERMINADA POR EDS. ....	37
TABELA 11: QUADRO RESUMO DOS RESULTADOS DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS NO VIDRO V20 (OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS). ....	39
TABELA 12: QUADRO RESUMO DAS DIFERENTES FASES CRISTALINAS ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS APÓS TRATAMENTO TÉRMICO. ....	40
TABELA 13: ÁREAS CALCULADAS NOS DIFERENTES VIDROS PARA ESTIMAR A CRISTALINIDADE .....	43

# *1      Revisão Bibliográfica*



## **1 Introdução**

Apesar do corpo humano ser uma “máquina” altamente complexa e eficiente é, no entanto, frágil. Especialmente com o aumento da idade, os ossos e os outros tecidos duros tornam-se mais vulneráveis à fractura, e consequentemente para os idosos as articulações tornam-se dolorosas, os dentes caem e os ossos têm tendência a fracturar.<sup>[1]</sup>

Há aproximadamente 30 anos, começou uma revolução nos cuidados médicos com a primeira substituição de tecidos ósseos bem sucedida. A partir deste ponto a medicina passou a dispor de duas alternativas a transplantação e a implantação.<sup>[2]</sup>

A colheita de tecidos de uma parte do paciente e a sua transplantação para a zona doente tornou-se o modelo *standard* para muitos procedimentos cirúrgicos. Este tipo de enxerto de tecidos levanta poucas preocupações éticas ou imunológicas, mas apresenta grandes limitações sobretudo ao nível da disponibilidade de tecidos. Uma solução parcial para esta limitação é a possibilidade de recorrer a transplantes de dadores humanos, quer vivos quer em cadáver. Contudo a necessidade de usar drogas imunossupressoras, a possibilidade de contaminações virais e questões de ordem ética e religiosa limitam o uso desta técnica. Por outro lado, o recurso a transplantes de tecidos ósseos de outras espécies conduz a resultados clínicos nem sempre satisfatórios, o que torna a abordagem ainda mais controversa.<sup>[2]</sup>

Uma importante frente na procura de soluções para a substituição de tecidos vivos, foi o desenvolvimento, ou em muitos casos a modificação, de materiais para interagirem com tecidos vivos. Desde as antigas experiências, realizadas por tentativa-erro, até à moderna ciência de materiais, foram desenvolvidos os mais diversos materiais das várias classes de cerâmicos, de metais, de polímeros e de compósitos. As vantagens mais significativas que os biomateriais para implantes apresentam em relação aos transplantes de tecidos são a sua disponibilidade e reprodutibilidade.<sup>[2]</sup>

O aumento da esperança de vida do ser humano levou à necessidade de considerar a possibilidade de aumentar 10-20 anos a vida útil dos materiais usados em biomedicina, relativamente à geração actual. Tornou-se imperioso que se operassem grandes melhoramentos na reparação clínica do esqueleto através, por exemplo, da criação de biomateriais capazes de promover a regeneração dos tecidos.

Para um cirurgião ortopédico a definição de implante ideal será um material capaz de executar a sua função sem toxicidade e sem que o hospedeiro apresente uma reacção de rejeição (corpo estranho), sendo posteriormente reabsorvido e completamente substituído por novo tecido.

É sobejamente conhecido que nenhum material implantado em tecidos vivos é completamente inerte, e que todos os materiais provocam uma resposta dos tecidos vivos mais ou menos acentuada.<sup>[1]</sup>

Quando um implante artificial é colocado em contacto com o osso (defeito ósseo), é geralmente encapsulado por tecido fibroso (não calcificado), que o isola do tecido ósseo circundante, e faz com que o implante não adira ao osso. Para conseguir que o conjunto apresente respostas equivalentes a solicitações físicas externas é necessário que se tenha criado uma ligação interfacial estável entre o implante e o osso.

Existem basicamente quatro tipos de resposta dos tecidos vivos a um implante, sumariadas na tabela 1.<sup>[3]</sup>

**Tabela 1:** Tipos de resposta dos tecidos ao implante.

SE O MATERIAL É TÓXICO	→	O TECIDO CIRCUNDANTE MORRE
SE O MATERIAL NÃO É TÓXICO E BIOLOGICAMENTE INACTIVO (QUASE INERTE)	→	FORMA-SE UM TECIDO FIBROSO DE ESPESSURA VARIÁVEL
SE O MATERIAL NÃO É TÓXICO E BIOLOGICAMENTE ACTIVO	→	FORMA-SE UMA LIGAÇÃO INTERFACIAL
SE O MATERIAL NÃO É TÓXICO E SE DISSOLVE	→	O TECIDO CIRCUNDANTE SUBSTITUI O IMPLANTE

Com base nos quatro tipos de resposta, os biomateriais podem ser divididos em quatro classes, que estão descritas na tabela 2.<sup>[4]</sup>

**Tabela 2:** Tipos de ligações dos biomateriais.

TIPO DE IMPLANTE	FIXAÇÃO	EXEMPLO
QUASE INERTE	SÃO DENSOS E SEM POROSIDADE, ADEREM ATRAVÉS DO CRESCIMENTO ÓSSEO NAS IRREGULARIDADES DA SUPERFÍCIE, PODENDO SER CIMENTADOS OU "PRESS-FITED" – FIXAÇÃO MORFOLÓGICA.	METAIS, ALUMINA, ZIRCONIA, POLIETILENO
POROSO	O CRESCIMENTO DO OSSO DÁ-SE PARA DENTRO DOS POROS, LIGANDO MECANICAMENTE O OSSO AO IMPLANTE – FIXAÇÃO BIOLÓGICA	HIDROXIAPATITE POROSA, METAIS REVESTIDOS A HIDROXIAPATITE POROSA
BIOACTIVO	A SUA REACTIVIDADE SUPERFICIAL PERMITE LIGAÇÃO QUÍMICA AO OSSO – FIXAÇÃO BIOACTIVA	VIDROS BIOACTIVOS, VIDROS-CERÂMICOS BIOACTIVOS, HIDROXIAPATITE DENSE
REABSORVÍVEL	EM PÓ OU SÓLIDO, PREPARADOS PARA SEREM LENTAMENTE ABSORVIDOS E SUBSTITUÍDOS PELO OSSO	SAIS DE FOSFATO DE CÁLCIO, ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) E OUTROS POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Nas últimas décadas a classe de biomateriais com comportamento bioactivo (tabela 2) tem tido grande divulgação, particularmente em aplicações dentárias e substituições ósseas.<sup>[1]</sup>

Estes biomateriais, com reactividade superficial específica, permitem a formação de ligações físico-químicas directas entre tecido ósseo e o implante, sem a formação de uma cápsula fibrosa. A estabilidade interfacial conseguida através de uma fixação bioactiva melhora consideravelmente a viabilidade do implante.<sup>[2]</sup>

A composição química dos biomateriais bioactivos inclui normalmente fósforo e cálcio tal como a parte mineral do tecido ósseo, embora isso não seja fundamental para o seu comportamento bioactivo. Estes materiais são geralmente cerâmicos densos de hidroxiapatite, vidros, vidros cerâmicos, compósitos ou revestimentos.<sup>[5]</sup>

O contínuo aumento da qualidade de vida e da esperança de vida no mundo moderno explica o interesse permanente e o significativo progresso na pesquisa e desenvolvimento de biomateriais nas últimas duas décadas.

A capacidade de materiais feitos pelo homem reproduzirem integralmente o material vivo que pretende substituir está dependente, não só de compatibilidade bioquímica mas também da compatibilidade biomecânica entre o material implantado e o organismo. Por isso, além de bioactivo o implante deve apresentar propriedades mecânicas

e físicas idênticas às do tecido vivo para conseguir substituir o osso com sucesso, sem correr riscos de rejeição.<sup>[6]</sup>

## 2 O Osso

Além de dar sustentação ao corpo, o esqueleto protege os órgãos internos e fornece pontos de apoio para a fixação dos músculos. O osso é constituído por peças ósseas e cartilaginosas articuladas, que formam um sistema de alavancas movimentadas pelos músculos.

Os ossos apresentam duas camadas: a mais externa e mais dura é chamada osso cortical, enquanto que a camada interna, mais esponjosa, é chamada osso trabecular. O osso está em constante renovação, os osteoclastos destroem os tecidos ósseos envelhecidos e os osteoblastos são responsáveis pela formação de osso novo. As células vivas presentes são responsáveis por 15% do peso do osso.

O osso, enquanto tecido duro, é basicamente um material compósito, constituído por uma matriz orgânica reforçada por uma fase mineral. A matriz orgânica é principalmente constituída por colagénio (quase 90%), que é a proteína mais abundante nos mamíferos, e constitui aproximadamente 30% da quantidade total de proteínas. Depois de serem segregadas pelas células, as moléculas de colagénio agrupam-se em fibras garantindo assim a integridade de tecidos como o osso, cartilagens, pele e tendões. De maneira a suportarem as tensões a que são sujeitas as fibras, formam-se ligações covalentes cruzadas entre moléculas de colagénio vizinhas.<sup>[7]</sup>

A fase mineral no osso é constituída por fosfato de cálcio, que aparece fundamentalmente na forma de hidroxiapatite parcialmente amorfa (HA:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), contendo não só iões de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ , mas também pequenas quantidades de  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e quantidades vestigiais de  $\text{F}^-$  e  $\text{Cl}^-$ .<sup>[7]</sup>

Esta fase inorgânica está envolvida em funções biomédicas e metabólicas no organismo e desempenha essencialmente dois papéis: por um lado providencia a estabilidade estrutural do esqueleto e, por outro, armazena iões de cálcio, fosfato, sódio, magnésio e carbonato entre outros, libertando-os quando necessário, para manutenção dos

níveis biológicos requeridos ou recebendo e aprisionando íons tóxicos como o chumbo e o estrôncio.<sup>[8]</sup>

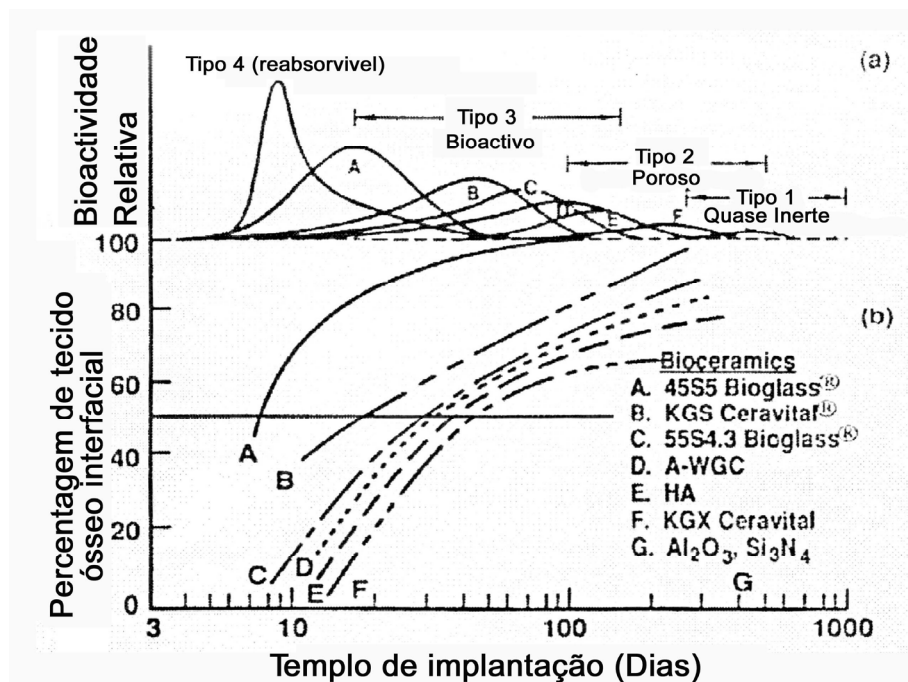
### **3 Bioatividade**

O conceito de bioatividade foi introduzido por Hench<sup>[5]</sup> com a descoberta de um material capaz de provocar uma reação biológica específica na interface com o tecido hospedeiro e responsável pela formação de uma ligação forte entre o tecido vivo e o material.

Entre os materiais que exibem esta propriedade, ditos materiais bioativos, citam-se os vidros como o Bioglass<sup>®</sup><sup>[3]</sup>, os vidros cerâmicos como o Ceravital<sup>®</sup><sup>[9]</sup> e A-W<sup>[10]</sup>, cerâmicos densos de fosfato de cálcio como a hidroxiapatite sintética<sup>[11]</sup> (HA), compósitos bioativos como o HAPEX<sup>™</sup> (compósito de polietileno de elevada densidade e hidroxiapatite)<sup>[12]</sup>. Apesar de todos eles terem capacidade de formar uma ligação interfacial forte com o tecido vivo adjacente, existem diferenças ao nível do mecanismo de ligação, do tempo que demora a processar-se a ligação, da espessura da camada de ligação, etc.<sup>[3]</sup>

A bioatividade relativa dos vários materiais (figura 1a) pode correlacionar-se com a taxa de formação da ligação interfacial do implante com o osso (figura 1b).<sup>[3]</sup>





**Figura 1:** Bioatividade de vários materiais em função do tempo de implantação: (a) bioatividade relativa (b) Percentagem de tecido ósseo interfacial.<sup>[6]</sup>

Hench<sup>[13]</sup> definiu uma forma de quantificar o carácter bioactivo de um material, através do índice de bioactividade de um material,  $I_B$  (equação 1), considerado como o tempo necessário para se formar mais de metade da ligação entre o implante e o tecido vivo.

$$I_B = \frac{1}{t_{0.5}}$$

(Equação 1)

em que  $t_{0.5}$  representa o tempo necessário para que 50% da interface esteja ligada ao osso.

Quando colocados no corpo, os materiais bioactivos ligam-se espontaneamente ao osso vivo através de uma camada apatítica formada à sua superfície, sem que se seja envolvida por tecido fibroso. A formação de uma camada apatítica quando o material é colocado em contacto com um líquido acelular que simule os fluidos corporais, indica a potencial bioactividade desse material.<sup>[14]</sup>

Desenvolvido por Kokubo e com uma concentração iónica idêntica à do plasma humano o SBF (simulated body fluid) designado por K9 é uma solução aquosa acelular

com pH entre 7.25 e 7.40. A composição iónica está descrita na tabela 3 comparativamente ao plasma humano.

**Tabela 3:** Concentração iónica do plasma humano e do SBF.<sup>[14]</sup>

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5

Nos materiais bioactivos (tipo 3 na figura 1) existe uma grande diferença na taxa de ligação e proliferação do osso, o que indica que diferentes factores bioquímicos estão envolvidos na interface tecido-implante, dependendo da composição e da cinética das reacções superficiais.

Para tentar distinguir estas diferenças Hench e Wilson<sup>[13]</sup> propuseram duas classes de bioactividade: Classe A - implantes osteoprodutivos (osteointutivos) e Classe B - implantes osteocondutivos.

A bioactividade de Classe A ocorre quando o material provoca uma resposta intracelular e extracelular na sua interface. A osteoprodução ocorre quando há proliferação de tecido ósseo numa superfície, devido a um aumento da actividade dos osteoblastos. Os implantes bioactivos osteoprodutivos apresentam elevados índices de bioactividade (IB = 8 a 13), e podem formar ligações tanto com tecidos moles como com o osso.

A bioactividade de Classe B ocorre quando o material provoca apenas uma resposta extracelular à sua superfície. Os implantes bioactivos de Classe B são osteocondutivos, ou seja, o implante simplesmente providencia uma interface biocompatível, sobre a qual o osso cresce. Os implantes bioactivos osteocondutores apresentam baixos níveis de bioactividade (IB = 3 a 6), e ligam-se apenas aos ossos.

Os materiais bioactivos de Classe A apresentam osteocondução e osteoprodução do osso enquanto que a Classe B apresenta apenas a osteocondução.

Na tabela 4 indicam-se as características de bioactividade de alguns biomateriais conhecidos.<sup>[2]</sup>

**Tabela 4:** Índice de bioactividade (*in vivo*), classe de bioactividade e tipo de resposta celular num defeito ósseo de vários biomateriais.

BIOMATERIAIS	IB=1/T0.5	CLASSE	REPOSTA CELULAR	
45S5 BIOGLASS®	12.5	A	OSSO E TECIDO MOLE	OSTEOPRODUTIVO
BIOGLASS®	12.5	A	OSSO E TECIDO MOLE	OSTEOCONDUTIVO
MOLDÁVEL				OSTEOPRODUTIVO
A-W	6	B	OSSO	OSTEOCONDUTIVO
CERAVITAL®	5	B	OSSO	OSTEOCONDUTIVO
HIDROXIAPATITE	3	B	OSSO	OSTEOCONDUTIVO
ALUMINA	0	NENHUMA	NENHUMA	CÁPSULA NÃO ADERENTE

A descoberta do Bioglass® e do conceito de bioactividade levou ao aparecimento de uma nova área de investigação em vidros e vidros cerâmicos para reparação e substituição óssea [6, 15-18].

O comportamento bioactivo de vidros e vidros cerâmicos é atribuído à capacidade de formação de uma camada apatítica na sua superfície, com uma composição e estrutura equivalente à fase mineral do osso [19].

O mecanismo pelo qual se processa a bioactividade de vidros e vidros cerâmicos, envolve complexos fenómenos físico-químicos, em que as várias etapas estão amplamente documentadas na literatura [20-30]. A composição química do vidro e vidro cerâmico, a topografia da superfície e a estrutura interna tem uma função importante na maneira como se processa a bioactividade [31-33].

As primeiras etapas ou reacções ocorrem na interface na presença de água destilada ou SBF não necessitando da presença de tecidos vivos. [34, 35]

Estas reacções resultam na formação de hidroxiapatite carbonatada (HCA) na superfície do vidro. A sequência destas reacções pode ser estruturada da seguinte maneira<sup>[34, 35]</sup>:

1. Troca rápida de iões alcalinos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  entre o vidro e a solução.
2. Perda de sílica solúvel do vidro para a solução. Ocorre devido à dissolução da sílica da rede vítrea por ataque dos iões hidroxilo que provocam a quebra de ligações Si-O-Si e a formação de Si-OH e  $\text{Si}(\text{OH})_4$ .
3. Condensação e repolimerização de espécies formadas, resultando uma camada superficial rica em  $\text{SiO}_2$ .
4. Migração de grupos de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  do vidro para a superfície. Estes grupos migram através da camada rica em  $\text{SiO}_2$ .
5. Formação de um filme amorfo rico em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ . Este filme forma-se por cima da camada rica em sílica em poucos minutos, uma vez que os passos anteriores são rápidos.
6. Crescimento da camada de sílica. A camada cresce através de difusão controlada de iões alcalinos.
7. Crescimento da camada amorfa rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ . A camada cresce por incorporação de fosfato de cálcio proveniente da solução.
8. Cristalização da camada amorfa rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ . A cristalização desta camada dá-se por incorporação de  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{F}^-$ .

Os passos de 6 a 8 são mais lentos do que os anteriores e o completo desenvolvimento da camada apatítica pode levar de 1-6 semanas.

A maior parte das composições de vidros e vidros cerâmicos usadas em aplicações biomédicas pertence a sistemas muito complexos, em que a função individual de cada componente não é completamente evidente. Apesar disso novos avanços têm vindo a ocorrer devido à aplicação das mais recentes técnicas experimentais que permitem estudar e distinguir o papel de cada elemento no comportamento do material.

A influência da sílica e do fósforo na bioactividade de vidros e vidros cerâmicos tem sido amplamente estudada. O efeito de alguns óxidos tais como  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,

$\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{FeO}_3$  e  $\text{F}_2\text{O}$  na reactividade superficial, tem sido referido para vidros do sistema  $\text{SiO}_2$ - $\text{CaO}$ , embora se encontrem na literatura referências a outros sistemas [26, 28, 31, 36]

## **4 Vidros e vidros cerâmicos**

O biomaterial ideal para implantação é aquele que é biológica e mecanicamente compatível com o osso.<sup>[37]</sup>

As propriedades mais importantes de um material bioactivo podem ser divididas em quatro categorias: mecânicas, físicas, químicas e biológicas. As propriedades físicas e mecânicas controlam as características funcionais da maior parte dos implantes, enquanto que as propriedades químicas e biológicas controlam a capacidade do implante manter a sua função ao longo de todo o tempo de implantação.<sup>[38]</sup>

Em grande parte dos biovidros produzidos através de fusão a altas temperaturas os componentes base encontrados são  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{MgO}$ . O primeiro e mais amplamente estudado é o Bioglass® 45S5 descoberto por Hench, no início dos anos 70, e formado por 45%  $\text{SiO}_2$ , 24.5%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24.5%  $\text{CaO}$  e 6%  $\text{P}_2\text{O}_5$  em percentagem mássica.<sup>[6, 39]</sup>

Além da fusão, os vidros também podem ser preparados por via sol-gel. Estudos recentes têm demonstrado um aumento da taxa de crescimento da camada apatítica quando se utiliza o método sol-gel. Este método permite também utilizar uma maior gama de composições e obter uma maior homogeneidade nos vidros bioactivos produzidos.<sup>[40-43]</sup>

A baixa resistência mecânica dos vidros bioactivos exclui a sua aplicação clínica em situações em que sejam sujeitos a cargas elevadas. Uma forma de melhorar a resistência mecânica é através da preparação de vidros cerâmicos por um processo de cristalização controlada dos vidros.<sup>[13]</sup>

Considerando que o osso e os dentes são materiais multifásicos, as suas propriedades serão provavelmente melhor reproduzidas por materiais multifásicos; a cristalização de vidros parece ser uma maneira eficaz de simular os tecidos duros.

Os vidros cerâmicos são produzidos através de, pelo menos, duas etapas: 1) fusão e formação do vidro; 2) ceramização. A adição de uma nova etapa ao processo de fabrico do

vidro para a obtenção de vidros cerâmicos traduz-se num custo superior, por isso, terá de haver benefícios associados.<sup>[44]</sup>

No desenvolvimento de vidros cerâmicos para aplicações biomédicas devem ser referidos dois tipos de materiais, que diferem na aplicação e como consequência nas propriedades pretendidas: materiais para utilização em ortopedia e materiais usados em medicina dentária. O primeiro grupo é usado na fabricação de próteses ortopédicas. O segundo grupo inclui os que são usados no tratamento e restauração de dentes, em coroas, pontes, vernizes e enchimentos.

Os requisitos dos vidros cerâmicos para estes dois tipos de aplicação são completamente diferentes. A ortopedia requer propriedades biocompatíveis e na maior parte dos casos bioactivas. Um vidro cerâmico bioactivo forma uma camada hidroxiapatítica carbonatada que permite a ligação com o osso e até com o tecido mole. Dependendo da sua aplicação, se deve ou não ser sujeito a cargas elevadas, os vidros cerâmicos podem necessitar de cumprir certos requisitos no que diz respeito à dureza, módulo de Young e resistência a fractura.

Em relação aos vidros cerâmicos para aplicações dentárias restaurativas, os requisitos são diferentes, uma vez que estes materiais têm de ser compatíveis com o ambiente oral, mas não deve ocorrer bioactividade na superfície do dente restaurado. Neste caso é importante que propriedades como a cor, a dureza e o desgaste correspondam às do dente natural. Como resultado destes diferentes requisitos, são utilizados sistemas químicos distintos e o desenvolvimento do vidro cerâmico é focado em diferentes fases cristalinas que apresentam diferentes propriedades.<sup>[45]</sup>

Os vidros e vidros cerâmicos fazem parte de um vasto grupo de materiais designados por biocerâmicos, a que pertencem também outros materiais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio. Estes têm sido amplamente estudados com vista ao desenvolvimento de materiais para uso clínico e podem ser preparados através de vários métodos, tais como precipitação, hidrólise, reacções de estado sólido e por técnicas de sol-gel.<sup>[46-50]</sup>

Todos os vidros e vidros cerâmicos bioactivos, bem como os cerâmicos de fosfato de cálcio formam uma ligação química interfacial forte com o osso. A força da ligação é normalmente equivalente ou superior à força do osso original, dependendo das condições de teste. Assim todos estes biomateriais apresentam uma excelente compatibilidade bioquímica (bioactividade). Contudo, os biovidros cerâmicos têm

resistência à flexão, tensão de ruptura, e tenacidade à fractura inferiores às do osso e apresentam um módulo elástico que é superior ao do osso. Isto significa que a maior parte dos biocerâmicos apresentam uma baixa compatibilidade biomecânica em aplicações onde são sujeitas a carga.<sup>[4, 51-53]</sup>

Outra maneira de tentar resolver as limitações biomecânicas de vidros e vidros cerâmicos bioativos é através da aplicação de filmes para revestir substratos mecanicamente fortes. Metais<sup>[54-56]</sup> e alumina<sup>[57]</sup> são usualmente utilizados como substratos.

Os revestimentos bioativos têm a excelente bioatividade dos vidros e dos cerâmicos aliada a capacidade biomecânica dos substratos. A capacidade de ligação deste tipo de materiais pode eventualmente ajudar a implantar próteses ortopédicas sem recorrer ao uso de cimentos. A desvantagem deste método é a fraca fiabilidade da ligação revestimento/substrato a longo prazo.<sup>[58-60]</sup>

Tradicionalmente, os vidros bioativos têm sido usados em aplicações clínicas na forma de bloco monolítico<sup>[61]</sup> ou em pó <sup>[62-65]</sup>. Estes materiais têm demonstrado propriedades anti-microbianas e anti-inflamatórias <sup>[66-68]</sup> muito promissoras para uma grande variedade de aplicações no campo da medicina regenerativa.

Como consequência das suas limitações biomecânicas os vidros e vidros cerâmicos são principalmente usados em situações de baixo esforço mecânico e em situações de esforço de compressão. As principais utilizações são: reparação do ouvido médio, substituição de vértebras e crista ilíaca.<sup>[6]</sup>

Na tabela 5 apresenta-se alguns biomateriais e as suas aplicações clínicas.

**Tabela 5:** Aplicações clínicas de algumas materiais

<b>Material</b>	<b>Aplicações Clínicas</b>
Bioglass®	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, tratamentos periodontais, reconstrução maxilo-faciais, enchimento de defeitos ósseos <sup>[69-72]</sup>
Ceravital®	Prótese do ouvido médio <sup>[73, 74]</sup>
Bioverit®	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, espaçador vertebral <sup>[75]</sup>
Cerabone® A/W	Próteses de vértebras, espaçador vertebral , crista ilíaca, enchimento de defeitos ósseos <sup>[76-78]</sup>
HA	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, tratamentos periodontais, reconstrução maxilo-faciais, enchimento de defeitos ósseos <sup>[49, 71, 79, 80]</sup>
PE/HA	Reconstrução de órbitas <sup>[72, 81]</sup>

Reconhecida a importância da formação de camada, é também essencial saber controlar a reactividade superficial dos materiais. Um vidro muito reactivo pode não permitir integração com o tecido hospedeiro, um vidro ou vidro cerâmico muito pouco reactivo pode tornar-se num material quase inerte no tempo considerado útil para as necessidades do organismo.

Neste trabalho tentou-se avaliar o efeito da ceramização de vidros na sua mineralização *in vitro*, de modo a sugerir formas de controlar (acelerar ou retardar) o processo de formação da camada de fosfato de cálcio.

Foram preparados dois vidros do sistema  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ , o vidro V25 de composição (%wt) 45,583  $\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$  29,93  $\text{SiO}_2$  24,49  $\text{MgO}$  e o vidro V20 (%wt) 54,89  $\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$  24,81  $\text{SiO}_2$  20,30  $\text{MgO}$ . Várias temperaturas foram usadas na ceramização de ambos os vidros, estes e os respectivos vidros cerâmicos foram analisados recorrendo à difracção de raios x e à microscopia electrónica de varrimento.

A reactividade dos vidros e vidros cerâmicos foi estudada por imersão de amostras prismáticas em SBF e a solução de SBF foi analisada por ICP antes e depois da imersão. As amostras foram observadas por microscopia electrónica de varrimento e os fosfatos de cálcio formados por espectroscopia de infravermelho. Também foi efectuada uma pequena abordagem à análise da bioactividade *in situ* recorrendo a um microscópio de força atómica.

No capítulo seguinte serão enumeradas as técnicas experimentais usadas, com especial ênfase na Microscopia de Força Atómica, por ser uma técnica relativamente pouco usual no estudo da bioactividade.





*2 Métodos e Técnicas Experimentais  
de Análise*



## **1 *Análise Térmica Diferencial***

A análise térmica diferencial (ATD) foi realizada num equipamento SETARAM LABSYS DTA/TG-DSC, com uma velocidade de aquecimento de 5 °C / minuto, de 25 a 1000 °C. Esta análise foi realizada no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro.

## **2 *Difracção de Raios X***

A análise de difracção de raios x (DRX) dos vidros, dos vidros cerâmicos e das fases precipitadas nos testes de imersão foram obtidos num difractómetro de raios x de marca Rigaku Geigerflex Dmax-C, equipado com monocromador curvo de grafite, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$ . Esta análise foi realizada no Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro.

## **3 *Espectroscopia de Infravermelho,***

Os espectros de absorção no infravermelho (FTIR, Fourier Transform Infrared Spectroscopy) foram registados num espectrofotómetro de marca SHIMADZU IR PRESTIGE-21 com transformadas de Fourier (FTIR), processado por computador, numa gama de número de onda entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). Este equipamento foi disponibilizado pela Escola Superior Aveiro Norte.

#### **4 *Espectroscopia por Emissão por Plasma Indutivo*<sup>[82]</sup>**

A determinação analítica dos elementos presentes em solução foi feita por ICP (Inductively Coupled Plasma emission spectroscopy) num espectómetro Jobin Yvon 70 Plus, no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

#### **5 *Microscopia Electrónica de Varrimento***

As superfícies das amostras foram observadas num microscópio electrónico de varrimento (SEM, Scanning Electron Microscopy) da Hitachi modelo S4100 e analisadas quimicamente por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy). Este equipamento foi disponibilizado pelo Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro.

#### **6 *Microscopia de Força Atómica***

A análise da superfície dos materiais foi também efectuada por microscopia de força atómica (AFM, Atomic Force Microscopy) num equipamento da Molecular Imaging modelo PicoPlus system. As análises de foram efectuadas no Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia Biomédica da Universidade do Porto.

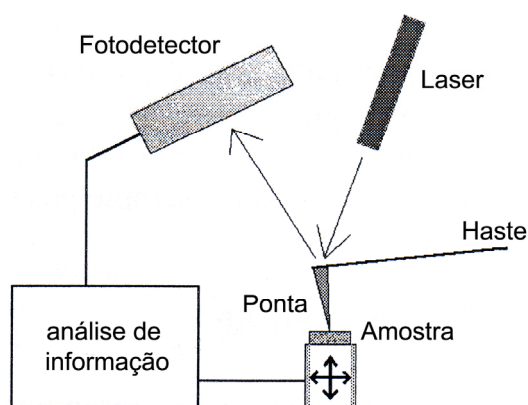
Dada a especificidade da técnica, a sua relativamente recente utilização na área dos biomateriais e atendendo ao investimento pessoal que a sua utilização exigiu faz-se, de seguida, uma breve descrição da técnica experimental de AFM.

De uma maneira geral o microscópio de força atómica apresenta grandes vantagens uma vez que permite a visualização de imagens 3D com resolução atómica, funciona em ambientes ao ar, em líquidos ou no vácuo. Pode determinar propriedades electrónicas, mecânicas e ópticas da superfície, bem como alterar a superfície movendo átomos um a um. Não utiliza qualquer tipo de lentes, utiliza uma pequena sonda que é colocada muito próxima da superfície da amostra e a interacção é medida e registada.

As vantagens referidas na alínea anterior são referentes a vários tipos de materiais, no caso dos biomateriais o AFM apresenta quatro vantagens quando comparada com técnicas convencionais de análise:

1. permite obter resoluções a três dimensões muito elevadas, entre dois e três nanómetros;
2. permite obter a topografia da superfície sem pré tratamento ou revestimento;
3. permite obter imagens em ambiente líquido e analisar as superfícies e a interface sólido/líquido em meio aquoso ou em outros ambientes líquidos.
4. permite medir outras propriedades da superfície, tais como: propriedades friccionais e características nano-mecânicas como a elasticidade e adesão.

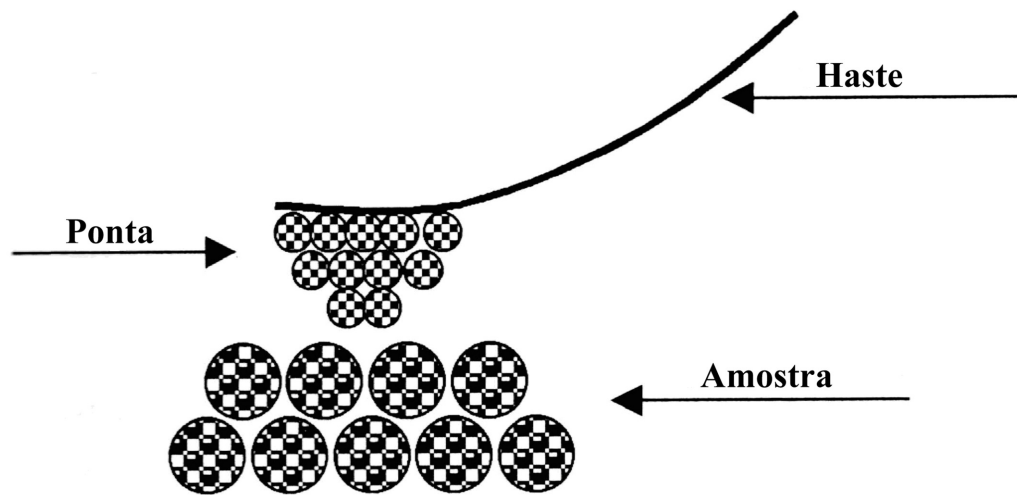
Para o seu funcionamento o AFM utiliza uma sonda muito fina que se move sobre a superfície da amostra. A sonda é um ponteiro na extremidade de uma haste, que dobra em resposta à força entre o ponteiro e a amostra. O esquema representado na figura 2 ilustra o funcionamento do AFM. À medida que a haste se move a luz do laser é reflectida para o fotodiodo a partir do qual é calculada a deslocação vertical da haste. O movimento da amostra é efectuado por cerâmicas piezo-eléctricas capazes de uma resolução sub-ångström nas direcções x, y e z. Por convenção o eixo dos z é perpendicular à amostra.



**Figura 2:** Esquema de um microscópio de força atômica.

A haste e o ponteiro são o coração do AFM, determinando a sensibilidade e a resolução da técnica. O ponteiro é de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) em forma de pirâmide com uma ponta muito afiada (raio terminal de 10-20 nm aproximadamente) o que confere à técnica uma excelente resolução.

O AFM regista as forças interatómicas existentes entre os átomos finais do ponteiro e a superfície da amostra como está esquematizado na figura 3. As forças podem ser repulsivas ou atractivas, o que justifica os vários modos de operação do AFM.



**Figura 3:** Desenho esquemático da sonda (haste + ponta) e da amostra.

As forças interatómicas originadas entre a ponta e a amostra resultam numa deflexão da haste, que pode ser medida como uma deflexão elástica. A magnitude da deflexão da haste depende da distância entre a ponta e a amostra. Uma vez que o deslocamento da haste obedece a lei de Hooke, a deflexão da haste é convertida numa força através da equação 2, onde  $F$  representa a força que actua na haste,  $k$  é a constante da mola (haste) e  $x$  é a deflexão da haste.

$$F = -kx \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo possível medir deslocações inferiores a  $1\text{\AA}$ , podem ser detectadas forças de apenas  $10^{-3}\text{ N}$ . Uma vez que o AFM mede forças, pode ser utilizado em amostras condutoras e não condutoras.

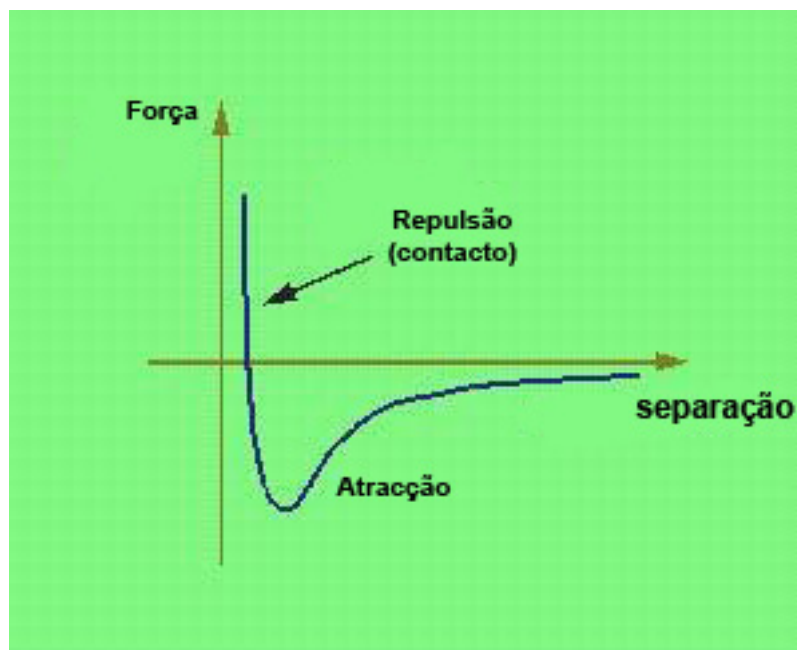
O AFM tem a capacidade de obter imagens de alta resolução de uma grande variedade de amostras. Para adquirir estas imagens topográficas, vários modos de operação têm sido desenvolvidos. Os modos básicos de aquisição de imagens topográficas são determinados pelo tipo de sondagem efectuada. Dependendo da força entre a ponta e a amostra é possível distinguir diferentes modos de aquisição de imagem:

- i. modo de contacto - quando se utiliza a força repulsiva;
- ii. modo de não contacto – quando se utiliza a força atractiva

#### **6.1.1 Modo de contacto (*contact mode*)**

O modo de contacto é o mais utilizado em AFM e, tal como o nome sugere, a ponta da sonda e a amostra estão em contacto à medida de a sondagem decorre. Neste modo, a ponta é arrastada pela superfície com uma velocidade constante e sob uma carga constante. A ponta está em contacto íntimo com a superfície, isto é, na região repulsiva da curva força-distancia (figura 4).





**Figura 4:** Curva de força em função (Newtons) da distância (Angstroms) da interação entre a ponta e a superfície da amostra.

A sondagem pode ser feita de duas maneiras diferentes: “height mode” se a deflexão da haste é mantida constante, e “deflection mode” se é medida a deflexão da haste. O contacto permite a determinação da topografia de superfície da amostra com elevada precisão, permitindo obter a maior resolução lateral de 0.2-0.3 nm. No entanto, é importante ter em atenção que a obtenção de resolução atómica no AFM é complexa, uma vez que, não só ocorre a interação de um único átomo no vértice da ponta e o mais próximo na amostra, mas também uma acumulação de interações de longa distância entre todos os átomos da ponta e da amostra.

Uma limitação deste modo é a possibilidade de a ponta danificar a superfície das amostras devido a forças de corte que são aplicadas na amostra durante a sondagem. Assim, mesmo com forças muito pequenas, da ordem do nano-Newton, podem resultar pressões e tensões de corte locais na ordem dos 0.1-100 GPa.

O modo de contacto é ideal para analisar superfícies inorgânicas duras, metais, polímeros, nos quais se incluem alguns biopolímeros. O modo de contacto pode ser usado para avaliar a estabilidade mecânica, a elasticidade local, as forças adesivas e as propriedades de fricção.

Contudo, para altas resoluções o modo de contacto dentro de um fluido é uma opção. Ao utilizar um meio fluido, algumas das forças que actuam entre a ponta e a

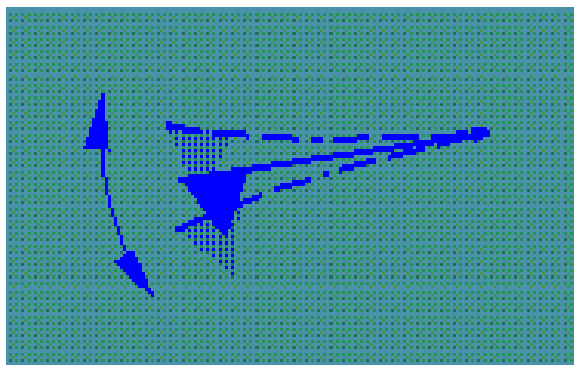
amostra são reduzidas ou eliminadas, permitindo analisar amostras, que normalmente se encontram em ambientes fluidos, no seu estado natural e permite também analisar as amostras em ambientes quimicamente activos.<sup>[83]</sup>

Tipicamente as amostras analisadas por este modo são: filmes finos de bio-cerâmicos, misturas de polímeros tais como poli(etileno, propileno) (PEP), polietileno de baixa densidade em condições aquosas, plaquetas humanas fixas em polietileno, grânulos de amido (de milho, batata, arroz, batata doce e trigo).

### 6.1.2 Modo de não contacto (*tapping mode*)

O *tapping mode* é o modo dinâmico mais usado em AFM, e pode ser usado ao ar ou em ambientes aquosos.

Neste modo, a haste é posta a oscilar na sua frequência de ressonância e o movimento lateral da ponta só ocorre acima da superfície, de maneira a que o contacto com a superfície só se dá numa pequena fracção do seu movimento oscilatório (figura 5).



**Figura 5:** Imagem exemplificativa do movimento da sonda em “tapping mode”.

A ponta ainda entra em contacto com a amostra, mas devido ao facto de ser só durante um breve período de tempo as forças de corte, criadas na amostra, são extremamente reduzidas, tal como a possibilidade de deformação inelastica da superfície. Assim, o *tapping mode* é o modo mais utilizado para analisar superfícies macias, com elevada resolução. Este modo foi escolhido para analisar a superfície dos materiais deste trabalho, porque permite detectar a topografia da superfície minimizando a força exercida sobre os precipitados formados.



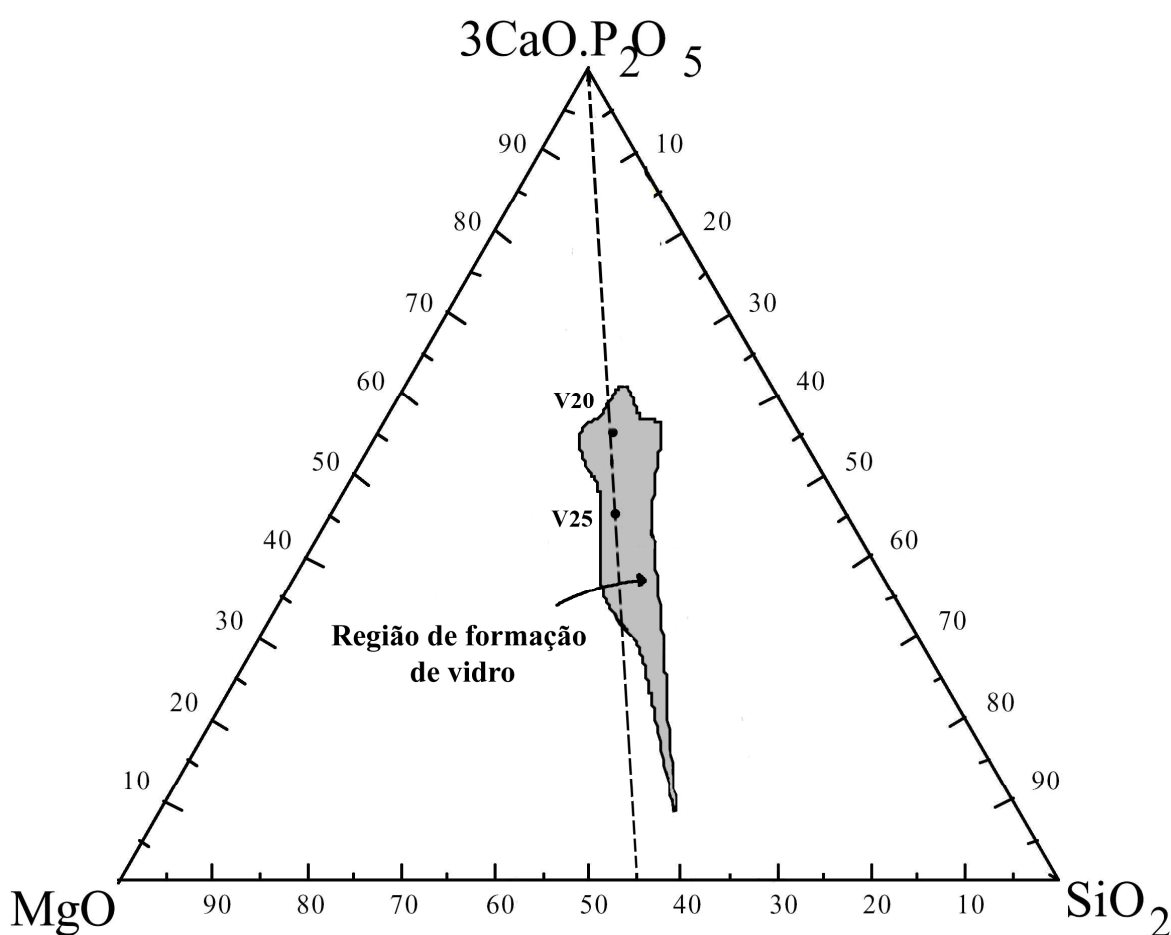
### *3 Resultados e discussão*



## 1 Preparação dos vidros

As composições estudadas pertencem ao sistema  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$ <sup>[84]</sup>, um sistema relativamente bem conhecido sobre o qual vários trabalhos têm sido desenvolvidos na forma de composição em que se incluem as estudadas neste trabalho<sup>[15, 31, 32, 85-88]</sup>.

A partir destes trabalhos foi possível obter o diagrama ternário (figura 6) e determinar a região com composições capazes de originar vidro (a cinza na figura).



**Figura 6:** Diagrama ternário do sistema  $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$  (%wt), com indicação da região de formação de vidro.

Nesta região foram seleccionados dois vidros V25 e V20 cujas designações expressam a percentagem mássica aproximada de óxido de magnésio na sua composição.

Ambos os vidros têm uma relação ponderal MgO/SiO<sub>2</sub> de 55/45 (linha a tracejado na figura 6).

A composição mássica dos vidros usados neste trabalho está expressa na tabela 6.

**Tabela 6:** Composição dos vidros V25 e V20 (% peso).

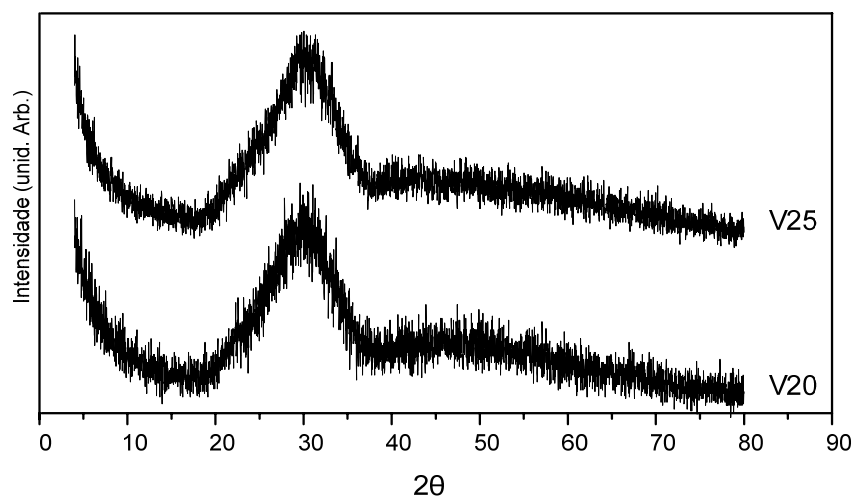
Composição	C <sub>3</sub> P* (%)	SiO <sub>2</sub> (%)	MgO (%)
V25	45,58	29,93	24,49
V20	54,89	24,81	20,30

\*3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Para a preparação dos vidros, foram seleccionadas como matérias-primas sílica (precipitada) da BDH, óxido de magnésio da Fluka e carbonato de cálcio da Fluka. Como fonte de fósforo utilizou-se o dihidrogenofosfato de cálcio mono-hidratado, também da Fluka.

As matérias-primas foram misturadas com álcool etílico e posteriormente colocadas num moinho planetário durante 45 minutos para assegurar uma boa homogeneização. Após uma etapa de secagem (24 horas a 70° C), as matérias primas foram fundidas num forno eléctrico, em cadinhos de platina, a uma temperatura de 1500°C. O fundido foi vertido para água, obtendo-se assim uma frita.

A análise de DRX efectuada à frita dos vidros V25 e V20 confirmou a sua natureza amorfa (figura 7).



**Figura 7:** Difractograma de DRX dos vidros V25 e V20 após a frita.

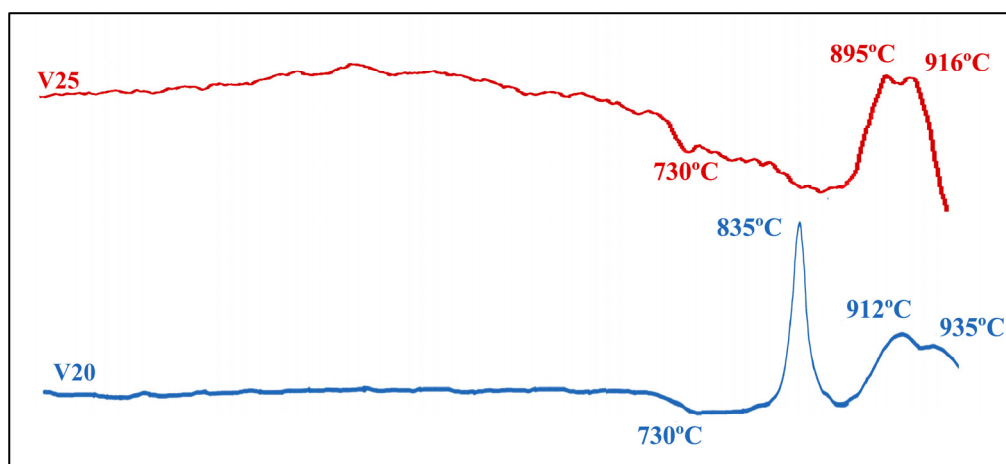


## 2 Preparação dos vidros cerâmicos

### 2.1 Análise térmica diferencial

Os vidros cerâmicos foram obtidos através de tratamentos térmicos efectuados aos vidros originais com base nas indicações fornecidas por Análise Térmica Diferencial (ATD). Esta técnica é uma ferramenta importante para a determinação da temperatura de recozimento e das temperaturas de cristalização.

Nas ATDs efectuadas aos vidros V25 e V20 observa-se que ambos os vidros têm uma temperatura de transição vítrea aproximada de 730°C (figura 8). Tendo em conta esta indicação e para garantir uma eficiente relaxação de tensões optou-se por fazer o recozimento de ambos os vidros a uma temperatura um pouco superior (750°C).



**Figura 8:** Análise Térmica Diferencial do vidro V20 e do vidro V25.

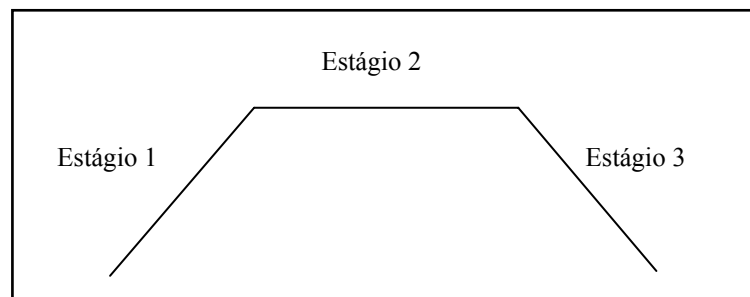
A principal diferença entre os dois vidros reside nas temperaturas dos picos exotérmicos de cristalização; o vidro V25 apresenta dois picos muito próximos a 895°C e 916°C, o vidro V20 apresenta um pico bem definido a 835°C e dois relativamente próximos a 912°C e 935°C.

A temperatura de recozimento e de cristalização serviram de referência para a programação dos tratamentos térmicos descritos no ponto seguinte.

## 2.2 Tratamentos térmicos de cristalização do vidro V25

Para a cristalização do vidro V25, foi elaborado um programa de tratamento térmico dividido em três estágios (figura 9):

- um estágio de aquecimento, a  $5^{\circ}\text{C}$  por minuto (estágio 1),
- um patamar à temperatura máxima, durante 2 horas (estágio 2),
- um estágio de arrefecimento, a  $5^{\text{a}}\text{C}$  por minuto (estágio 3).



**Figura 9:** Esquema do programa de tratamento térmico usado nos tratamentos térmicos ao vidro V25 (o mesmo foi seguido para o vidro V20).

Nos vários tratamentos térmicos a única diferença existiu na temperatura máxima do patamar. Foram utilizadas amostras de vidro V25, transparente, em blocos monolíticos. As temperaturas de patamar e as características macroscópicas observadas após os tratamentos térmicos estão resumidas na tabela 7.

**Tabela 7:** Quadro resumo dos resultados do tratamento térmico ao vidro V25 (observações macroscópicas)

Tratamentos Térmicos		Características Macroscópicas
Temperatura de patamar (°C)	Forma	Observações
910	Igual	Semi-opaco
920	Igual	Semi-opaco
930	Igual	Exterior branco Interior semi-opaco
940	Igual	Exterior branco Interior semi-opaco
950	Deformou	Exterior branco Interior semi-opaco
960	Deformou	Exterior branco Interior semi-opaco
980	Deformou	Interior homogêneo de cor branca
1000	Deformou	Interior homogêneo de cor branca

As amostras resultantes do tratamento térmico foram reduzidas a pó para serem analisadas por DRX. Na tabela 8 encontra-se o resumo das fases cristalinas encontradas nos materiais obtidos às diferentes temperaturas de patamar.

**Tabela 8:** Quadro resumo das diferentes fases cristalinas encontradas nas amostras após tratamento térmico.

Temperatura	Fases cristalinas			
910	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
920	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
930	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
940	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
950	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
960	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	
980	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	+ Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]
1000	Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]	+ Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]

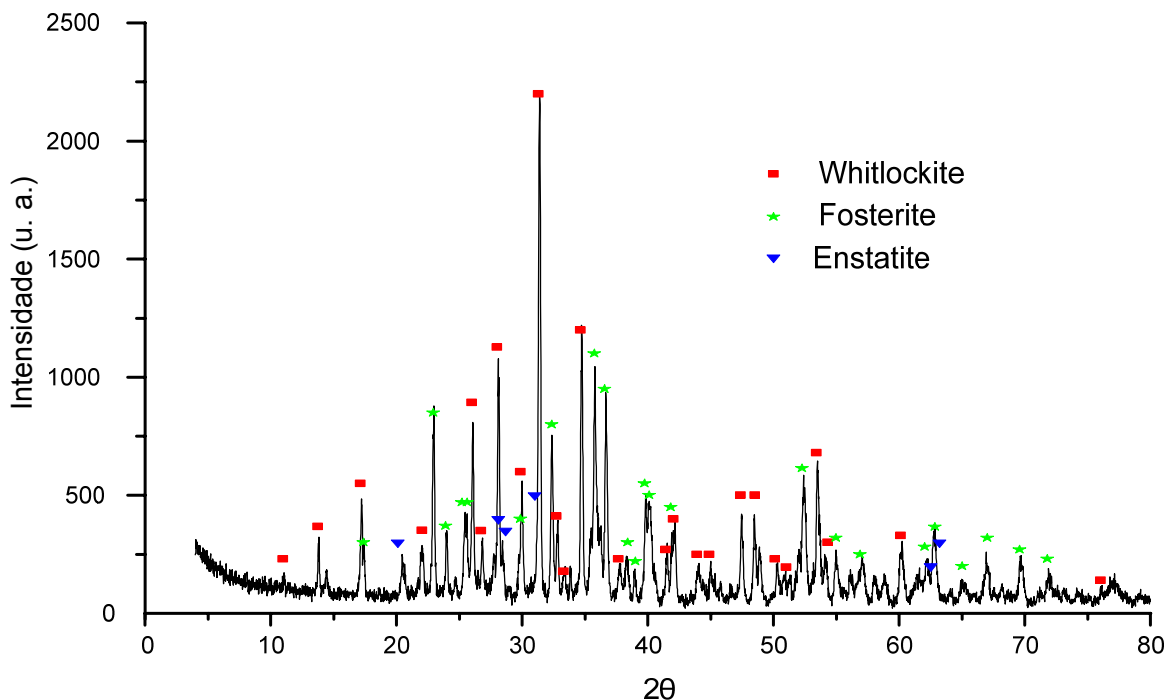
Verificou-se que a formação da fase cristalina de fosfato de cálcio e magnésio e de fosterite é praticamente simultânea. Até 980°C houve a transformação da fase cristalina de

fosfato de cálcio e magnésio em whitlockite, diminuindo a percentagem molar de magnésio na fase cristalina (tabela 9). A partir desta temperatura dá-se a formação de uma terceira fase (enstatite). Como não se observou alteração no difractograma de DRX e nas características macroscópicas das amostras tratadas acima dos 980°C escolheu-se esta temperatura para preparar o vidro cerâmico do vidro V25 a utilizar nos ensaios de bioactividade. O vidro cerâmico será denominado a partir de agora por V25C

**Tabela 9:** Percentagem molar teórica das diferentes fases de fosfato de cálcio encontradas nos vidros ceramizados a partir do vidro V25

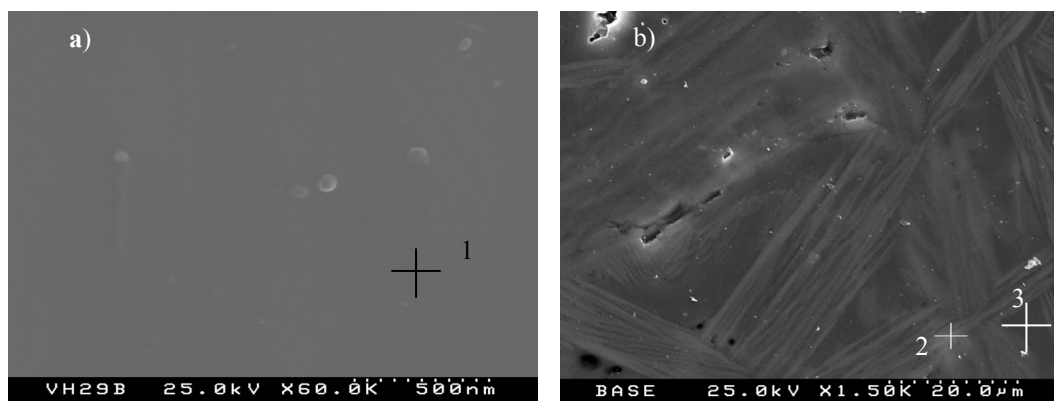
Fases cristalinas	Ca (%)	Mg (%)	P (%)
Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2.589</sub> MgO <sub>0.411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	52	8	40
Whitlockite [Ca <sub>18</sub> Mg <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>14</sub> ]	53	6	41

Na figura 10 está representado o difractograma de DRX correspondente ao V25C.



**Figura 10:** Difractograma de DRX do vidro V25 após tratamento térmico a 980°C

A observação da superfície por SEM (figura 11) das amostras antes e depois do tratamento térmico e após polimento, evidencia bem a diferença microestrutural existente entre as duas. Enquanto que na figura 11a é notório que a superfície é praticamente homogênea, na figura 11b podem observar-se uns cristais alongados de whitlockite, presentes em grande quantidade, e outros cristais de formas angulosas correspondentes à fosterite e à entastite.



**Figura 11:** Imagem de SEM da superfície polida de: a) V25 b)V25C.

A análise semiquantitativa por EDS (tabela 10) permite determinar a composição elementar das diferentes fases presentes. Pode observar-se que as relações nominais entre os vários componentes do vidro original  $\left( \text{Ca/P, Mg/Si, } \frac{\text{Mg} + \text{Si}}{\text{Ca} + \text{P}} \right)$  são semelhantes às determinadas por EDS, considerando o erro inerente à técnica de EDS.

Na figura 8b é evidente a existência de duas zonas distintas: uma mais escura e outra mais clara. A zona mais escura (zona 3 na figura 11 e na tabela 10) tem uma razão  $\frac{\text{Mg} + \text{Si}}{\text{Ca} + \text{P}}$  igual a 4,08 indicando ser rica em magnésio e silício e que apresenta uma relação Mg/Si de aproximadamente 2 que é semelhante à da fosterite ( $\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ ). A zona mais clara de aspecto fibroso (zona 2 na figura 11 e na tabela 10), é principalmente constituída por fósforo e cálcio, e apresenta uma razão Ca/P de 1,31 que se aproxima da razão para a whitlockite (1,29).

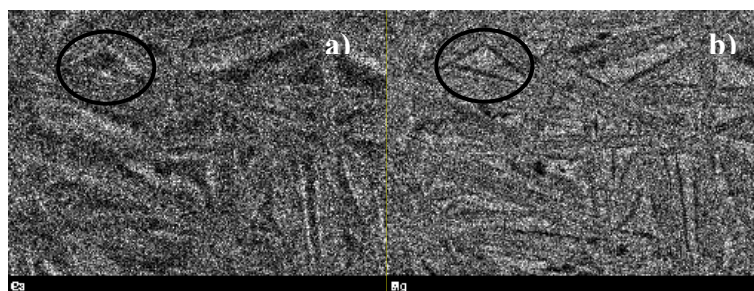
**Tabela 10:** Tabela resumo da composição nominal atômica determinada por EDS.

Zona da figura 11		Mg	Si	P	Ca	Ca/P	Mg/Si	$\frac{Mg + Si}{Ca + P}$
<b>Vidro original</b>		27,44	28,97	34,66	8,93	3,88	0,95	1,29
<b>V25</b>	1	10,48	10,15	19,21	5,89	3,26	1,03	0,82
<b>V25C</b>	2	7,99	5,03	12,43	16,28	1,31	1,59	0,45
	3	20,33	9,23	5,51	1,74	0,32	2,20	4,08

De maneira a observar as diferenças composicionais existentes na superfície do material, foi efectuado um mapa de EDS.

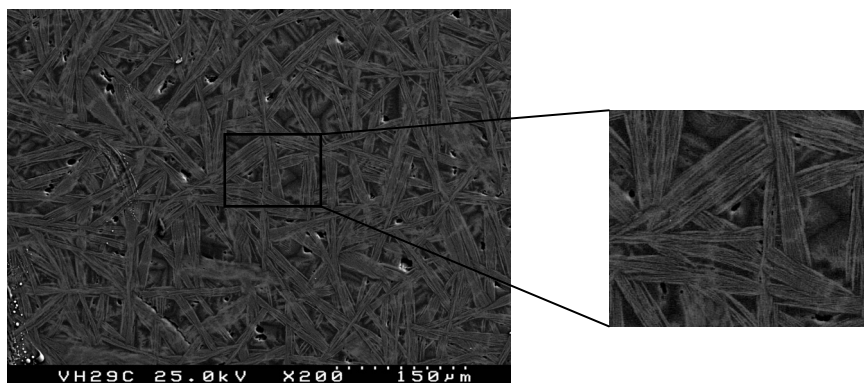
Varrendo determinada superfície é possível criar uma imagem a duas dimensões que traduz a distribuição de um dado elemento na superfície do material analisado. Um sinal forte (elevada concentração do elemento) é normalmente mostrado como um ponto brilhante e um sinal fraco (baixa concentração do elemento) aparece a preto.

A figura 12a representa a sobreposição de dois mapas de EDS, referentes aos elementos Ca e P, e a figura 12b mostra a sobreposição dos mapas referentes aos elementos Mg e Si.

**Figura 12:** mapas EDS para o vidro V25C a) Ca e P; b) Si e Mg.

A zona triangular mais escura delimitada pelo círculo na figura 12a indica inexistência ou baixa concentração dos elementos Ca e P nesta zona. Na figura 12b essa zona está mais brilhante indicando que tem uma elevada concentração de Mg e Si. Tendo em conta que os silicatos de magnésio formam estruturas triangulares, a zona assinalada deve corresponder a um cristal de enstatite ou de fosterite.

Na figura 13 temos uma imagem obtida através de electrões retrodispersados que ilustra a presença e distribuição dos cristais de whitlockite no vidro cerâmico V25C.



**Figura 13:** Imagem de electrões retrodispersados de V25C.

Como podemos observar na figura 13 os cristais de whitlockite são muito finos e de formas alongadas encontrando-se dispersos pela matriz vítrea formando uma rede tridimensional. A sua identificação através de mapas de EDS (figura 12) não foi possível, porque o raio de interacção do feixe de electrões é maior que o tamanho de cristal, obtendo-se assim informação não só da whitlockite mas também da fase vítrea adjacente.

### **2.3 Tratamentos térmicos de cristalização do vidro V20**

Nos tratamentos térmicos efectuados ao vidro V20 seguiu-se a mesma metodologia usada com o vidro V25, esquematizada na figura 9. Nos vários tratamentos térmicos a única diferença foi a temperatura máxima de patamar. Na tabela 11 indicam-se as temperaturas e as características macroscópicas observadas após o tratamento térmico.

**Tabela 11:** Quadro resumo dos resultados dos tratamentos térmicos no vidro V20 (observações macroscópicas).

Tratamentos Térmicos Temperatura de patamar (°C)	Características Macroscópicas	
	Forma	Observações
830	Igual	Semi-opaco
840	Igual	Semi-opaco
850	Igual	Pequeno aumento da opacidade
860	Igual	Pequeno aumento da opacidade
870	Igual	Pequeno aumento da opacidade
880	Igual	Pequeno aumento da opacidade
890	Igual	Opaco
900	Igual	Opaco
910	igual	Opaco
920	igual	Opaco
930	igual	Opaco
940	igual	Opaco
950	igual	Opaco
1000	igual	Opaco

Algumas das amostras resultantes dos tratamentos térmicos foram reduzidas a pó para serem analisadas por DRX, estando os resultados resumidos na tabela 12.

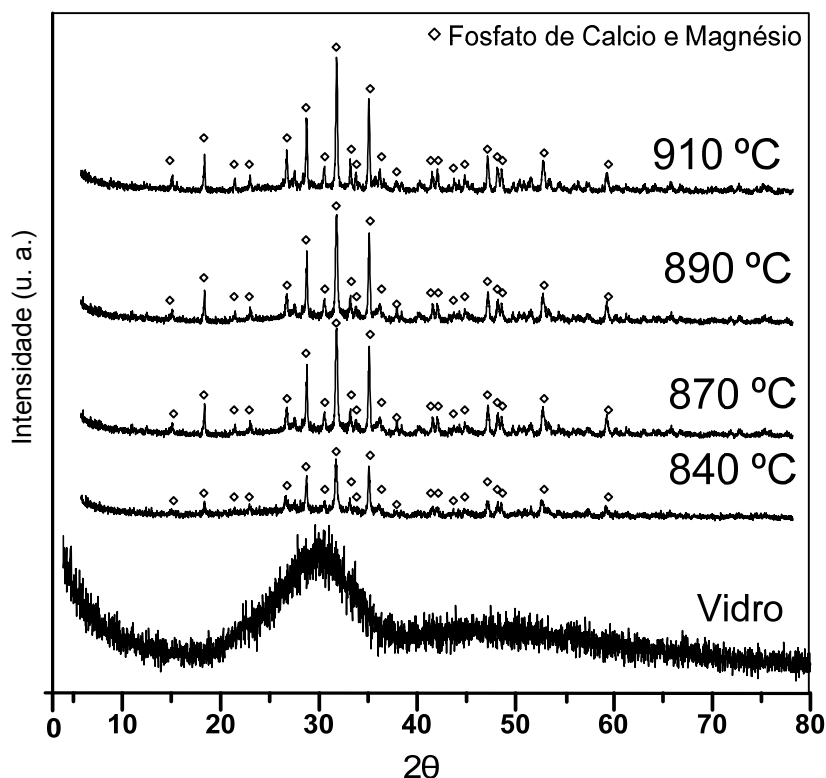


**Tabela 12:** Quadro resumo das diferentes fases cristalinas encontradas nas amostras após tratamento térmico.

Temperatura	Fases				
830	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
840	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
850	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
860	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
870	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
880	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
890	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
900	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
910	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]				
920	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]
930	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]
940	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]
950	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]
1000	Fosfato de cálcio e magnésio [(Ca <sub>2,589</sub> MgO <sub>0,411</sub> )(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	+	Enstatite [MgSiO <sub>3</sub> ]	+	Fosterite [Mg <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> ]

Como pode verificar-se na tabela 12, entre 830°C e 910°C forma-se apenas uma fase, identificada como um fosfato de cálcio e magnésio. A partir dos 920°C verificou-se a presença de mais duas fases, enstatite e fosterite.

Na figura 14 estão representados os difractogramas de DRX das amostras tratadas a diferentes temperaturas onde é clara a evolução da cristalização, desde a estrutura amorfa do vidro até a formação bem definida de um fosfato de cálcio e magnésio. Os picos correspondentes a temperaturas mais baixas apresentam baixa intensidade observando-se um progressivo aumento da intensidade à medida que aumenta a temperatura.

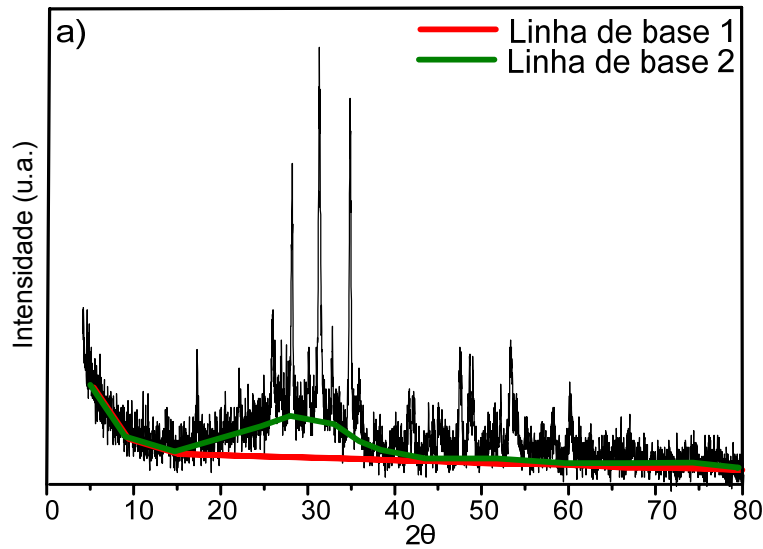


**Figura 14:** Difractogramas de DRX do vidro V20 e dos seus vidros cerâmicos.

Com base no método usado por Krimm *et al*<sup>[89]</sup>, pode-se quantificar a cristalinidade através da razão entre a área da intensidade difractada cristalina (**Ac**) e a área da intensidade difractada total (cristalina mais amorfa).

Na figura 15 encontra-se exemplificado o método seguido para o cálculo das áreas. A área delimitada pela linha de base 1 (a vermelho) e a linha do difractograma do vidro ceramizado a 840°C (a preto) corresponde à área da intensidade difractada total que é a soma da área da intensidade difractada cristalina (**Ac**) mais a área correspondente a intensidade difractada amorfa ou “background” (**Aa**). A área da intensidade difractada cristalina é delimitada pelo difractograma e a linha de base 2 (a verde).

Para o cálculo das áreas foi utilizada o programa informático OriginPro® da OriginLab Corporation.



**Figura 15:** Diffractograma de DRX do vidro cerâmizado a 840 °C com indicação das linhas de base utilizadas no calculo da cristalinidade.

Os valores obtidos para o exemplo da figura 15 e para os vidros cerâmizados a outras temperaturas encontram-se na tabela 13. Estes indicam que o aumento da temperatura de cristalização produz uma diminuição da área do “background”, o que corresponde a uma diminuição da quantidade de fase amorfa presente no vidro cerâmizado ou seja a um aumento da cristalinidade, traduzido pelo índice de cristalinidade

$$IC = \left( \frac{Ac}{Ac + Aa} \times 100 \right) \text{ da amostra.}^{[90]}$$

Para quantificar a fase amorfa ainda presente nos vidros cerâmicos, foi efectuada uma adaptação dos métodos usados por Ohlberg *et al*<sup>[91]</sup> e por Cervinka *et al*<sup>[92]</sup>, em que a quantidade de fase amorfa (Fa) é calculada a partir da razão entre a área Aa presente no vidro não tratado termicamente e a área Aa presente nos vidros cerâmicos

$$\left( Fa = \frac{Aa_{(vidro\ cerâmico)}}{Aa_{(vidro)}} * 100 \right).$$

Os valores de IC e Fa obtidos estão expostos na tabela 13. A partir do valor da fase amorfa (Fa) foi calculado o valor de fase cristalina ainda presente (Fc = 100 – Fa)

**Tabela 13:** Áreas calculadas nos diferentes vidros para estimar a cristalinidade

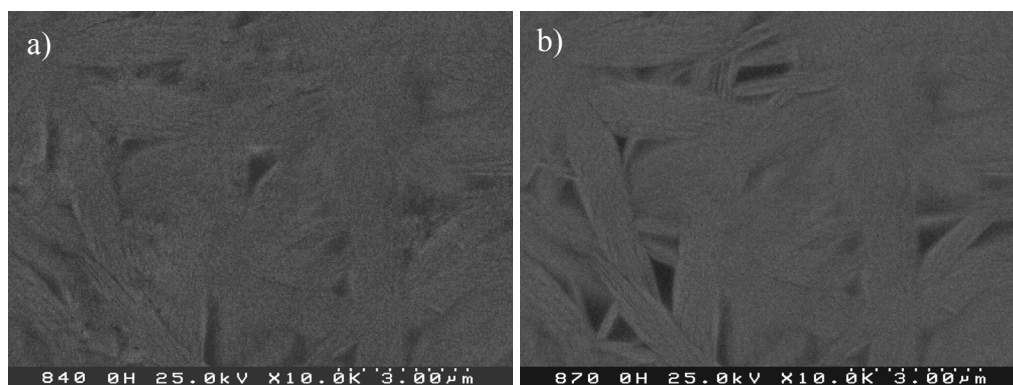
Temperatura de patamar	Area da intensidade difractada (Origin®)			IC(%) <i>Krimm et al</i>	Fa(%) / Fc(%) <i>Ohlberg et al e por Cervinka et al</i>
	Total	Cristalina	<i>Background*</i>		
840°C	5248	2071	3176	39	53/47
870°C	5542	3415	2126	62	36/64
890°C	5637	4139	1497	73	25/75
910°C	5239	4303	935	82	16/84

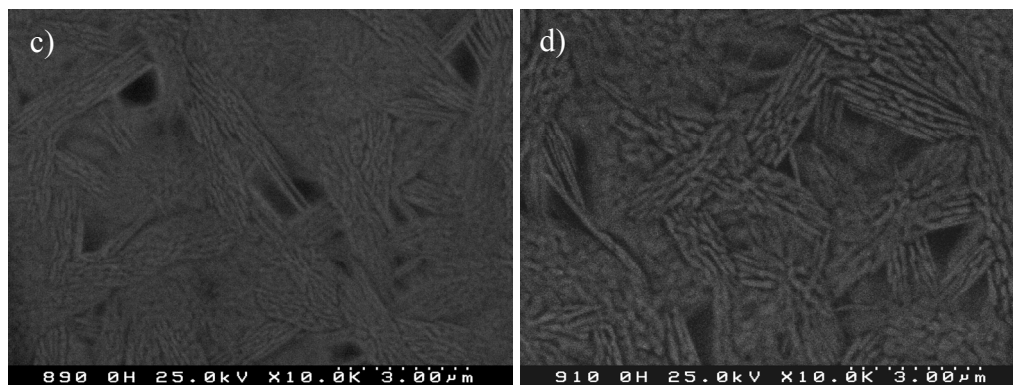
\*quantificação do pico amorfo no vidro não tratado termicamente (Aa = 5976)

Conforme indicado na tabela 13 ambos os métodos utilizados apresentaram valores similares de índice de cristalinidade ( $IC \approx Fc$ ) das amostras testadas. Estes métodos permitem uma quantificação relativa de fase amorfa e do índice de cristalinidade.

O método seguido não permite uma quantificação absoluta. Para tal seria necessário recorrer a outros métodos mais morosos e mais dispendiosos, recorrendo por exemplo, ao uso de padrões internos<sup>[93, 94]</sup> e à combinação com técnicas químicas e de microscopia<sup>[95-97]</sup>. Também é possível quantificar através do método de Rietveld<sup>[98]</sup>. Lutterotti<sup>[99]</sup> apresentou um procedimento baseado neste método capaz de determinar o tamanho de cristais e quantificar não só as fases cristalinas como também a fase vítrea. O método utiliza princípios de modelação microestrutural baseados no trabalho de LeBail<sup>[100]</sup>, para a desconvolução do padrão de difracção obtido para amostras em pó.<sup>[101, 102]</sup> Devido à complexidade do método optou-se por não o utilizar.

O aumento da percentagem de fase cristalina, com o aumento da temperatura de patamar, pode observar-se visualmente nas imagens obtidas por SEM através de um detector de electrões retrodispersados (figura 16).

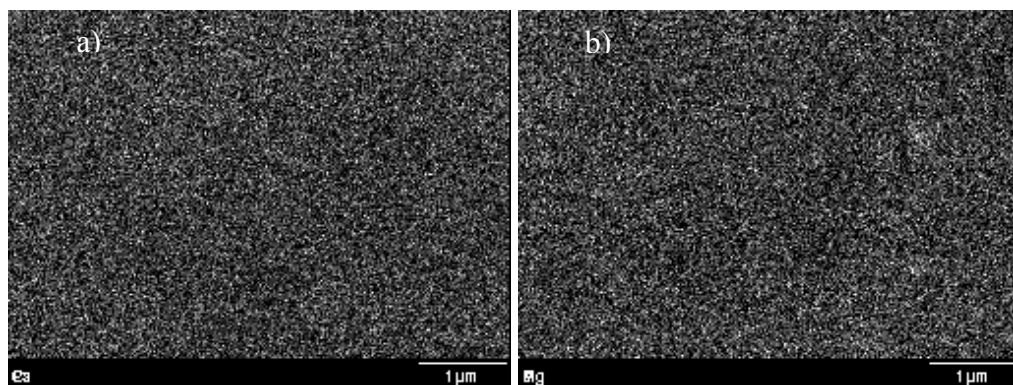




**Figura 16:** Imagens de electrões retrodispersados do vidro V20 cristalizados a: a) 840 b) 870 d) 890 e d) 910.

A utilização de EDS (figura 17) para mapear a superfície, tal como foi utilizada no vidro cerâmico V25C, não permitiu distinguir a fase de fosfato de cálcio da fase amorfa. O mesmo sucedeu com a tentativa de identificar a whitlockite no vidro V25 e deve-se ao facto do volume de interacção do feixe de electrões ser superior ao tamanho do cristal.

A ausência de zonas ricas em Si e Mg confirma a ausência de silicatos de magnésio.



**Figura 17:** Mapas de EDS para V20C-910 a) Ca e P; e b) Si e Mg].

### **3    *Ensaaios de bioactividade***

Os ensaios de bioactividade também chamados testes *in vitro* em meio acelular, têm como finalidade avaliar a reactividade superficial de materiais, quando são imersos num fluido que simula o plasma humano, através da observação das modificações na superfície do material e das alterações de concentração do fluido de imersão.

Foram preparadas amostras prismáticas com dimensões de 1,0x1,0x0,2 cm polidas com lixas de granulometria sucessivamente mais fina, até ao acabamento com uma lixa de veludo molhada com uma suspensão de alumina (0,3  $\mu\text{m}$ ).

As amostras polidas foram limpas em banho de ultra sons, primeiro com acetona e depois com água ultra pura. Posteriormente foram colocadas em frascos com 10 ml de solução de SBF, de acordo com um protocolo referido na literatura <sup>[88, 103, 104]</sup>. Foram efectuados testes com a duração de 1 hora, 2 horas, 1 dia, 5 dias e 7 dias para todas as amostras e de 10, 20, 30 dias e 5 meses para as amostras cristalizadas.

A próxima parte da apresentação de resultados está dividida por materiais estudados. Serão apresentados em primeiro lugar os resultados da observação física da superfície do material por microscopia electrónica de varrimento, complementada com a análise química semi-quantitativa por EDS, dos precipitados formados, sobre o vidro e sobre os respectivos vidros cerâmicos. Seguem-se os resultados da análise por ICP das concentrações dos iões Ca, P, Mg e Si na solução de SBF em função do tempo de imersão e, por fim, apresentar-se-ão os resultados da caracterização dos precipitados formados sobre o vidro e vidros cerâmicos, por espectroscopia de infravermelho e por DRX.

#### **3.1    Vidro V25**

Tanto o vidro V25 como o vidro cerâmico V25C desenvolveram, em SBF, uma camada superficial que, por EDS, se veio a confirmar ser rica em cálcio e fósforo. A camada depositada à superfície do vidro V25 formou-se muito mais rapidamente do que no vidro cerâmico, mas revelou-se muito pouco aderente.

Nas primeiras duas horas de imersão na solução de SBF observa-se uma pequena alteração na superfície do vidro, consistente com a existência de dissolução do vidro para a solução (figura 18).

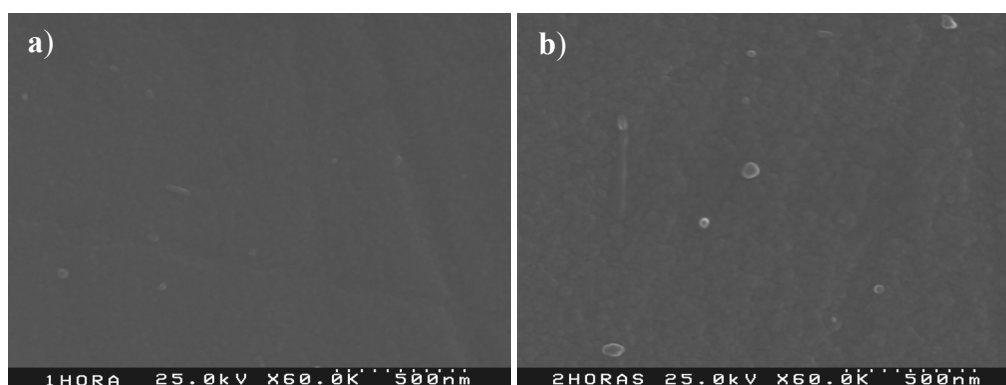
Ao fim de um dia toda a superfície do vidro revela os efeitos da dissolução superficial que está a ocorrer (figura 19). Pequenos depósitos de fosfato de cálcio já são visíveis, ainda que, por serem muito finos, não é possível uma inequívoca identificação química por EDS, uma vez que a área de interação muito provavelmente atinge o vidro subjacente.

A análise química por EDS da superfície mostra uma pequena diminuição da relação Ca/P (1,72 para 1,47), provavelmente devido a uma elevada taxa de dissolução de cálcio a partir da superfície para o meio.

Com 5 dias de imersão o vidro está coberto por camadas de fosfato de cálcio, como podemos ver na figura 20a. A imagem também demonstra a fraca aderência da camada ao vidro. A análise química da camada por EDS mostra um grande aumento de cálcio e fósforo com uma relação Ca/P de 1,32, similar ao OCP ((octacalcium phosphate, Ca/P=1,33).

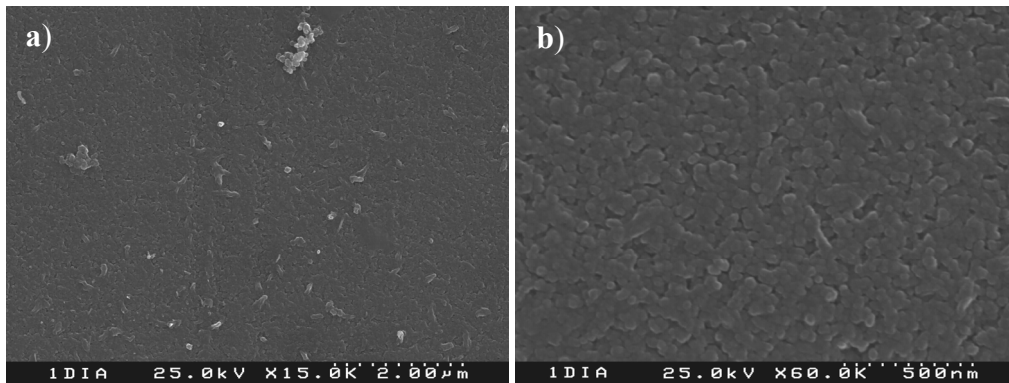
Ao fim de 7 dias de imersão (figura 21) as camadas vão-se depositando por cima das camadas já existentes sem uma ligação forte entre elas. A fraca aderência entre a camada formada e o vidro subjacente neste sistema também tem sido reportada por outros autores.<sup>[31, 88]</sup>

A morfologia do precipitado é similar à de uma hidroxiapatite (esferolites aciculares) e apresenta uma razão Ca/P de 1,70 similar à da hidroxiapatite.

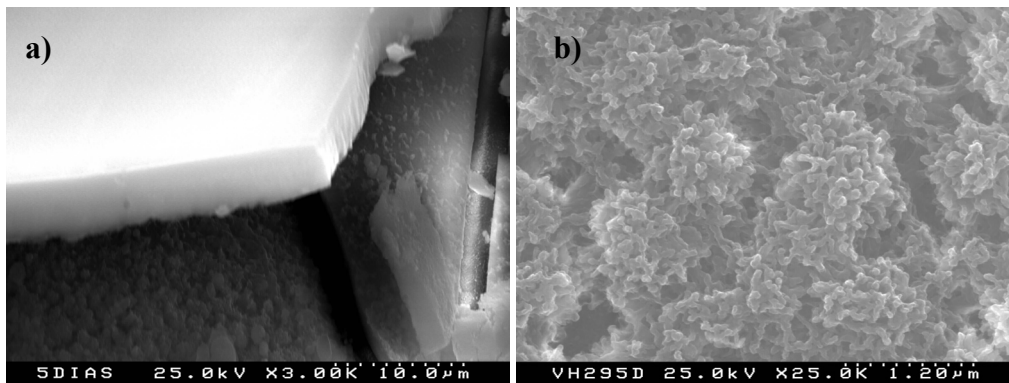


**Figura 18:** Imagem de SEM da superfície do vidro V25, com vários tempos de imersão em SBF:

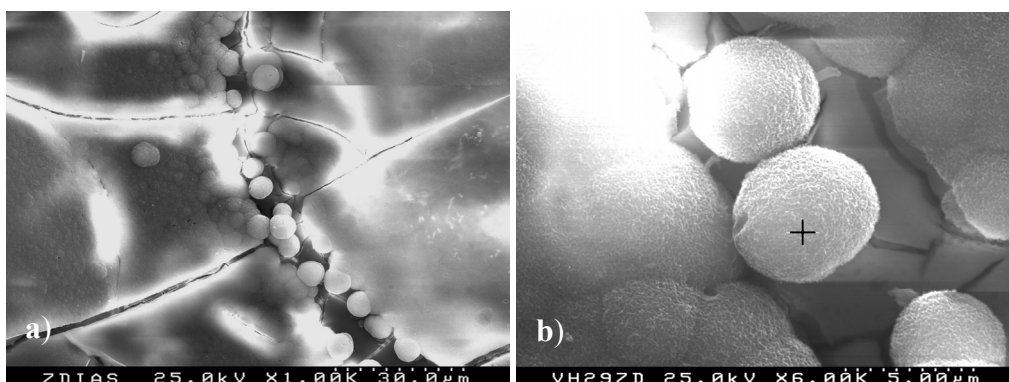
a) 1 hora, b) 2 horas.



**Figura 19:** Imagem de SEM da superfície do vidro V25, com 1 dia de imersão em SBF,  
a) ampliação 15.000 vezes b) ampliação x60.000 vezes.



**Figura 20:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25 com 5 dias de imersão em SBF,  
a) ampliação 3.000 vezes b) ampliação x25.000 vezes.



**Figura 21:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25 com 7 dias de imersão em SBF,  
a) ampliação 1.000 vezes b) ampliação 6.000 vezes.



### 3.1.1 Vidro cerâmico V25C

O tratamento térmico efectuado ao vidro original teve como principal objectivo melhorar a aderência do depósito de fosfato de cálcio formado em fluidos fisiológicos sintéticos. Na maioria dos estudos efectuados por outros autores a cristalização é feita com o objectivo de melhorar as propriedades mecânicas do vidro original [15, 45, 105-108].

O vidro cerâmico estudado nos ensaios de imersão foi obtido por tratamento térmico de acordo com o esquema apresentado na figura 9 e apresenta fases cristalinas de whitlockite, fosterite e entastite.

Nos testes de imersão o vidro cerâmico V25C as primeiras horas revelam sinais de dissolução de iões para a solução. Esta dissolução ocorre principalmente na fase amorfa, provavelmente devido à maior estabilidade química das fases cristalinas. (figura 22).

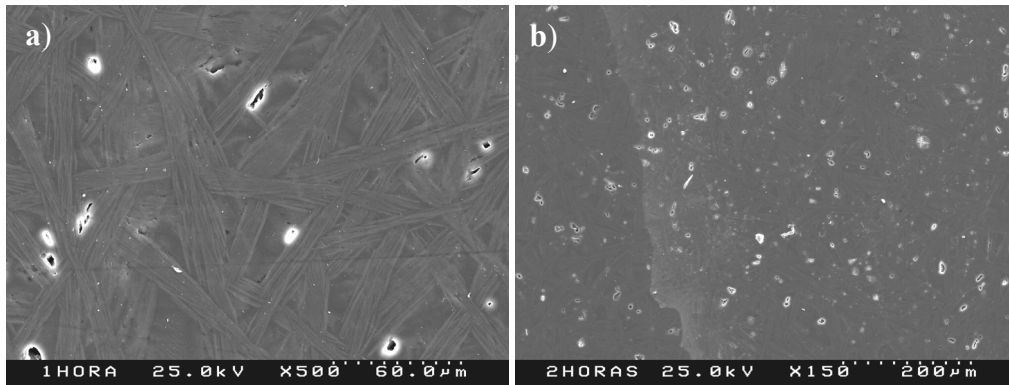
Com 5 dias de imersão (figura 23b) a dissolução continua a ser a principal reacção química a decorrer na superfície do material, sendo visíveis pequenas formações de precipitados na superfície. Contudo a sua pequena dimensão não permite determinar a composição química por EDS.

Com 7 dias de imersão (figura 24a) é visível um aumento da formação e do tamanho dos precipitados em relação aos 5 dias de imersão. Apenas com 10 dias de imersão (figura 24b) se observa a formação uma placa de fosfato de cálcio. No caso presente esta começou a desenvolver-se a partir de um defeito.

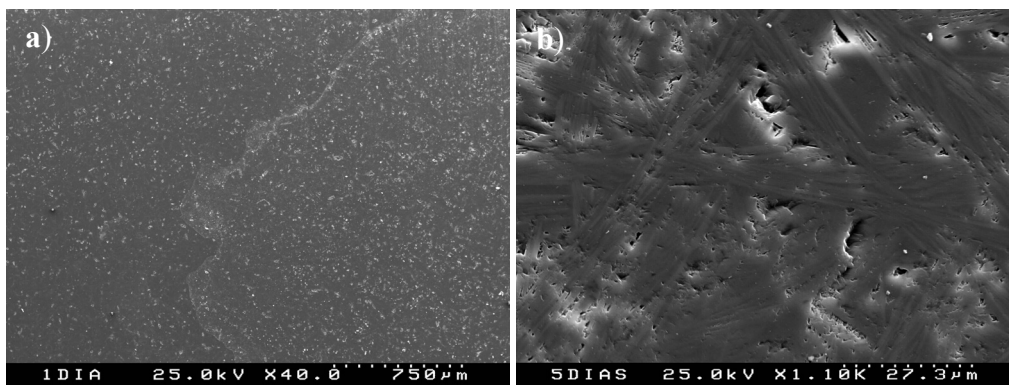
Aos vinte dias (figura 25) a camada continua a desenvolver-se e o precipitado formado apresenta uma morfologia típica de um OCP. A razão Ca/P aumenta de 0,94 no depósito após 10 dias para 1,53 após 20 dias.

Por fim com 30 dias de imersão uma grande camada de fosfato de cálcio está depositada na superfície do material (figura 26). A razão Ca/P do depósito para 30 dias é de 1,58.

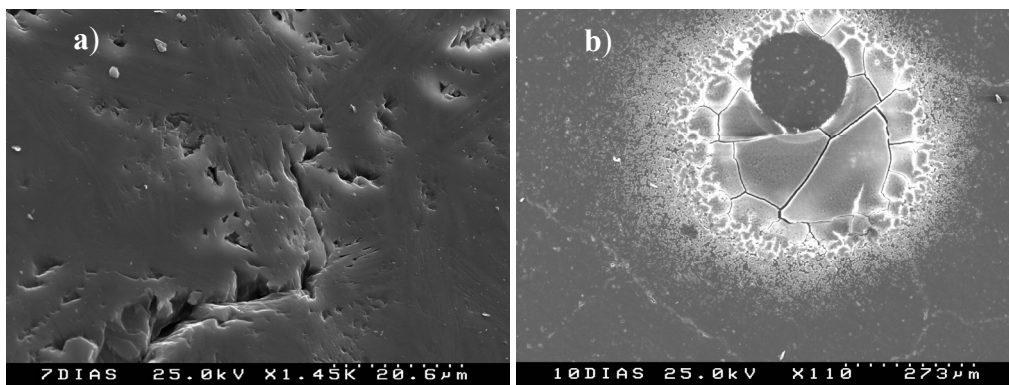
Foram efectuadas ensaios de 5 meses de imersão (figura 27) em que o SBF foi substituído mensalmente. O precipitado que cobre por completo a superfície do vidro têm uma razão Ca/P de 1,47 inferior ao de 30 dias.



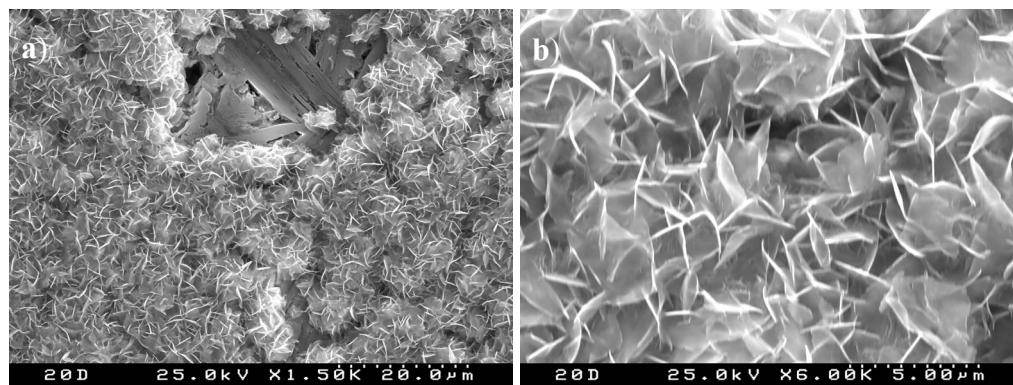
**Figura 22:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25C com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão.



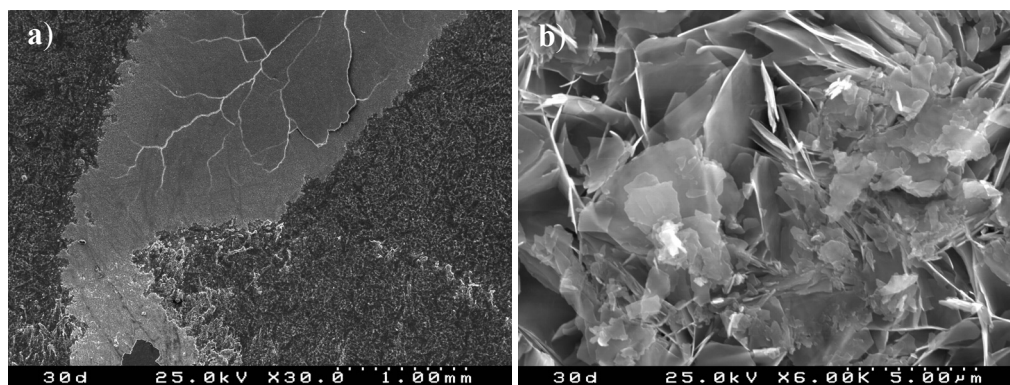
**Figura 23:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25C com: a) 1 dia de imersão; b) 5 dias de imersão.



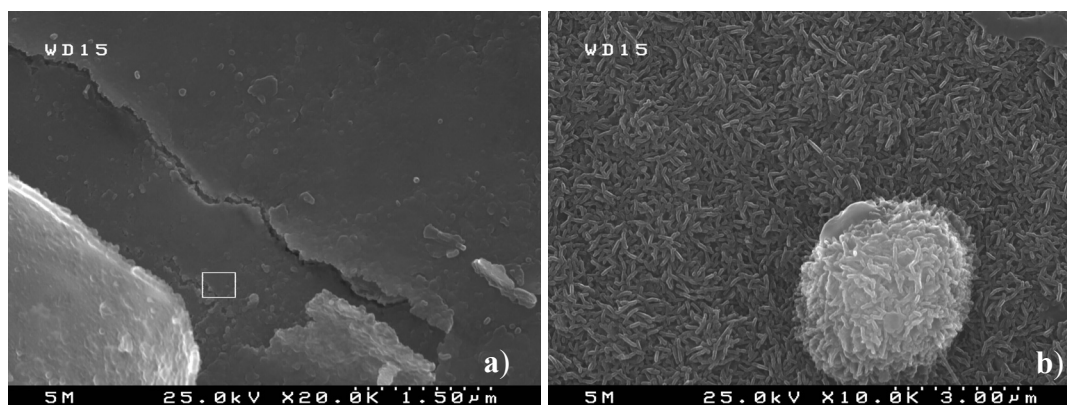
**Figura 24:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25C com: a) 7 dias de imersão; b) 10 dias de imersão.



**Figura 25:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25C com 20 dias de imersão,  
(a) ampliação 1500 vezes (b) ampliação 6000 vezes.



**Figura 26:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25C com 30 dias de imersão,  
(a) ampliação 30 vezes (b) ampliação 6000 vezes.



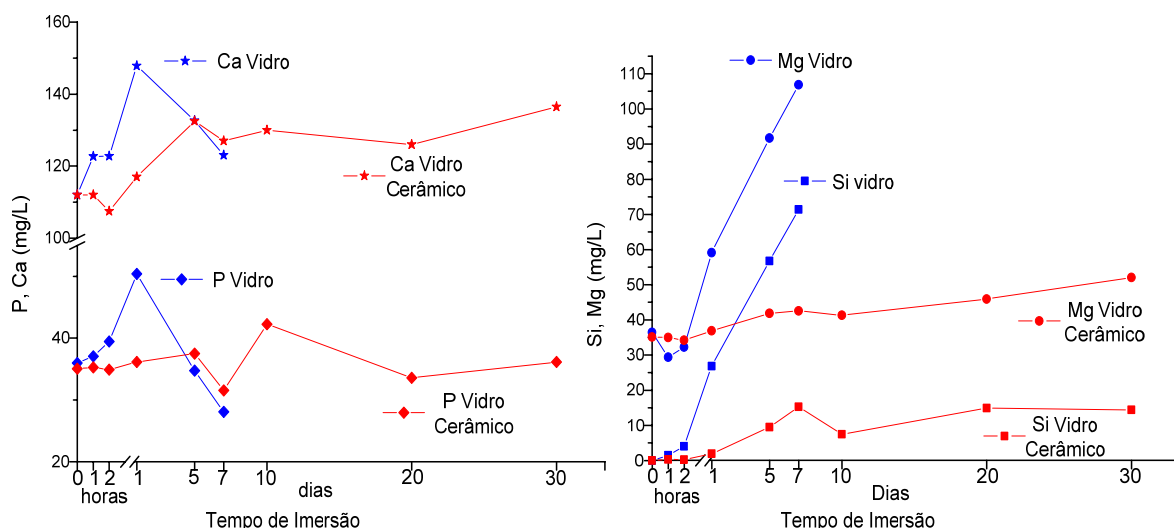
**Figura 27:** Imagens de SEM da superfície do vidro V25 cristalizado com 5 meses de imersão,  
a) ampliação 20.000 vezes b) ampliação x10.000 vezes.

### **3.1.2 Análise das trocas iônicas entre a solução e o material**

Na figura 28 apresenta-se a variação das concentrações elementares de Si, Mg, Ca e P nas soluções de SBF onde estiveram imersas as amostras de vidro V25 e V25C. A determinação foi feita por ICP.

Para o vidro V25, nas duas primeiras horas de imersão não existe grande precipitação nem dissolução de íons, à exceção de um ligeiro aumento da quantidade de cálcio, logo na primeira hora de imersão. No V25 há, num período inicial, uma dissolução de íons de fósforo e cálcio que atinge um máximo ao fim do primeiro dia de imersão, observando-se a partir desse período a diminuição da concentração destes íons em solução, presumivelmente por precipitação sob a forma de um fosfato de cálcio à superfície do vidro. Esta diminuição que indica o consumo de íons Ca e P da solução está de acordo com as imagens de SEM (figura 19) onde se observa o início da formação de precipitados. Paralelamente existe uma contínua dissolução de íons de silício e magnésio a partir do vidro para a solução (figura 28b).

O vidro cerâmico V25C apresenta um comportamento totalmente diferente: A quantidade de magnésio em solução permanece praticamente inalterável até ao primeiro dia, a partir do qual sofre um aumento gradual até aos 30 dias de imersão. No caso do silício, a partir do primeiro dia de imersão observa-se um aumento, ainda que ligeiro em comparação com o vidro V25. A quantidade de silício em solução aumenta até aos 7 dias de imersão, havendo uma ligeira quebra quando se passa para os 10 dias e por fim mantém-se relativamente estável até aos 30 dias de imersão. A quantidade de fósforo em solução mantém-se praticamente constante durante os trinta dias de imersão, havendo apenas algumas oscilações entre os 7 e os 10 dias, precisamente a altura em que começa a observar-se a deposição da camada de CaP. Por sua vez, a quantidade de cálcio presente na solução mantém-se constante nas primeiras horas de imersão, aumenta até ao quinto dia, e por fim permanece estável até ao trigésimo dia.

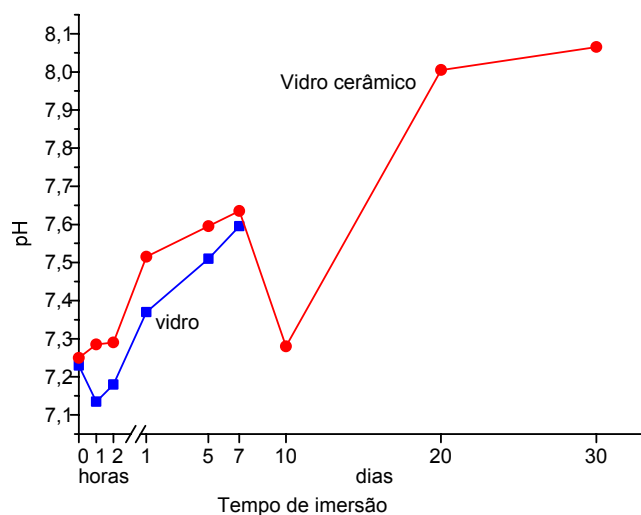


**Figura 28:** Variação da concentração elementar da solução de SBF após imersão da amostra de vidro V25 e vidro cerâmico V25C

A variação do pH da solução de SBF ao fim dos vários tempos de imersão do vidro V25 e do vidro cerâmico V25C está representado na figura 29. Para o vidro o decréscimo de pH, que ocorre nas primeiras horas de imersão, pode ser explicado pelo aumento da quantidade de sílica em solução, um fenómeno bem conhecido na indústria vidreira, que ocorre no fim da fusão dos vidros quando se processa a digestão da sílica residual <sup>[109]</sup>.

O valor constante do pH nas primeiras horas de imersão para o vidro cerâmico V25C deve-se provavelmente à maior dificuldade de dissolução dos iões numa matriz vítrea bastante menos abundante que no caso do vidro V25. Após esta fase dá-se uma evolução similar do valor de pH para os dois vidros, com uma tendência para se igualarem.

A redução do valor de pH entre 7 e 10 dias pode estar relacionado com o aumento da concentração de P no SBF (figura 28a) que acidifica a solução. Esta ocorrência poderá dificultar a precipitação de fosfatos de cálcio, usualmente mais estáveis em ambientes básicos.

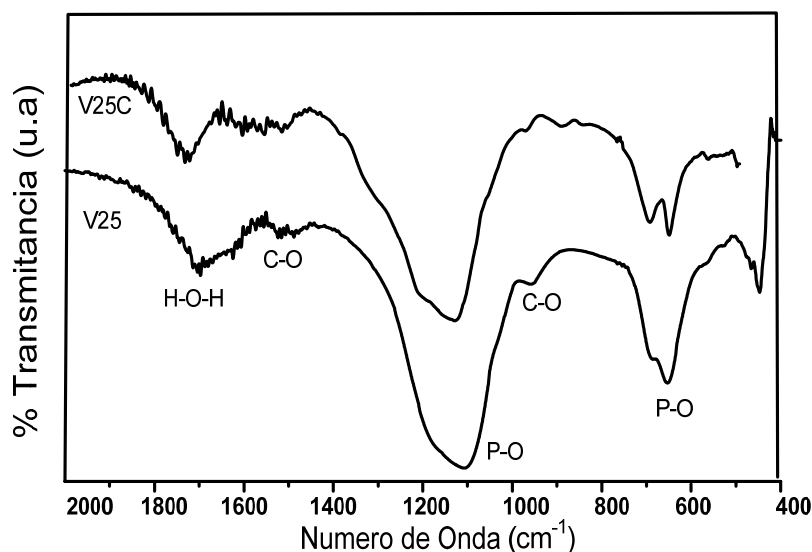


**Figura 29:** pH da solução de SBF ao fim dos vários tempos de imersão do vidro V25 e V25 cristalizado.

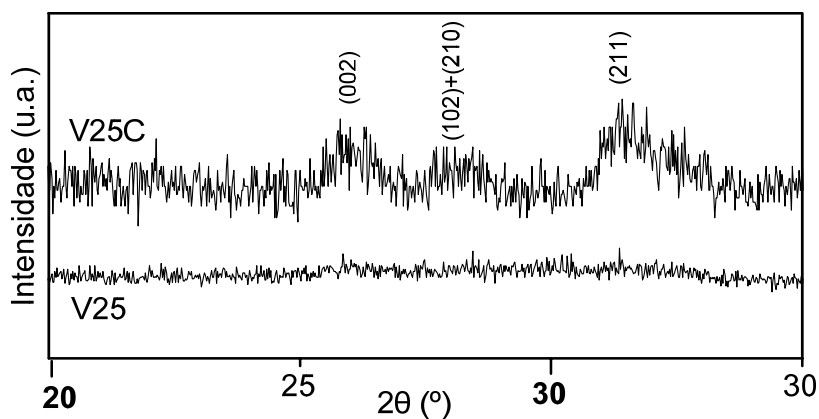
### 3.1.3 Análise da camada formada

As camadas formadas sobre o vidro e sobre o vidro cerâmico foram analisadas por espectroscopia de infravermelho e por DRX de baixo ângulo.

O espectro de IV do vidro e do vidro cerâmico apresentam picos coincidentes com os picos característicos de uma hidroxiapatite carbonatada. Os picos referentes à vibração da ligação P-O (bending) surgem a 560, 575 e 603  $\text{cm}^{-1}$  enquanto que a vibração P-O (stretch) absorve a 1060 e 1030  $\text{cm}^{-1}$ . Ambas estão presentes nos dois vidros, mas a fraca cristalinidade da camada formada no vidro V25 reflecte-se numa diminuição da definição dos picos. A vibração C-O do grupo carbonato apresenta dois picos a 1450 e 1410  $\text{cm}^{-1}$  e um terceiro a 870  $\text{cm}^{-1}$ . Por fim a 1628  $\text{cm}^{-1}$  temos um pico que identifica a presença de água adsorvida.<sup>[49, 110]</sup>



**Figura 30:** Espectro de Infravermelho do vidro V25 após 7 dias de imersão e respectivo vidro cerâmico após 5 meses de imersão.



**Figura 31:** Difratograma de DRX do vidro V25 após 7 dias de imersão e respectivo vidro cerâmico após 5 meses de imersão.

Pela técnica de DRX detectou a presença de picos típicos de uma apatite no vidro cerâmico, e a baixa cristalinidade da camada precipitada sobre o vidro foi confirmada pela total ausência de picos no difratograma. No entanto a presença de camada apatítica logo a partir do 1 dia de imersão foi detectada por SEM (figura 19), por EDS que mostrou uma variação de Ca/P de 1,74 para 1,47 e por resultados de ICP (figura 28) que indicaram o consumo de Ca e de P a partir do 1º dia.

### 3.2 Vidro V20

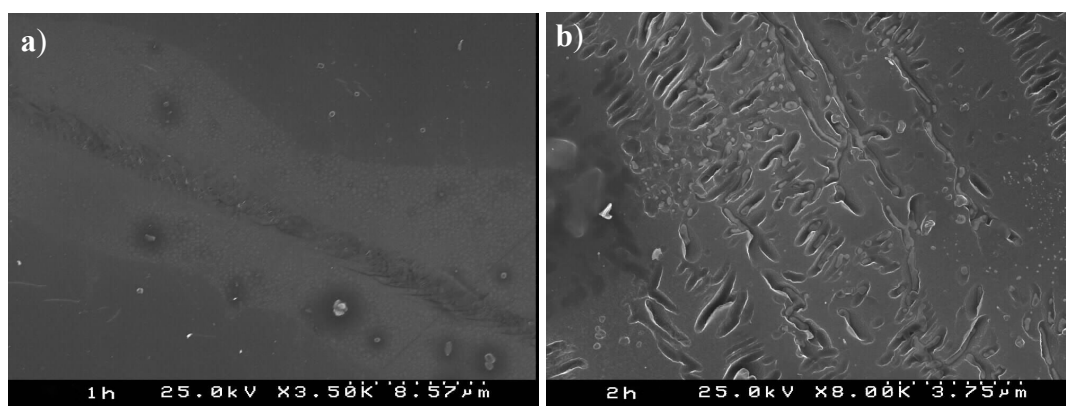
No caso do vidro V20 ao fim de 7 dias de imersão desenvolveu-se uma camada superficial que por EDS, se veio a confirmar ser rica em cálcio e fósforo.

Nas primeiras horas de imersão observa-se principalmente a dissolução do vidro (figura 32). São visíveis pequenas formações de depósito mas sem tamanho suficiente para determinar a sua composição por EDS.

Com um dia de imersão já se observa uma camada completamente formada (figura 33). A camada apresenta uma relação Ca/P de 1,53, com muito pouca quantidade de Si e Mg, indicando assim que esta já apresenta uma espessura suficiente para o resultado não ter sido influenciado pelo substrato.

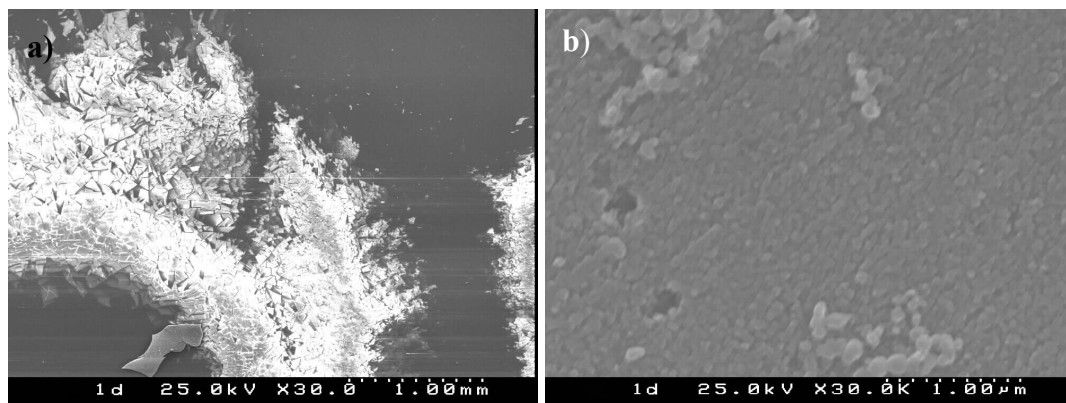
Por fim, com 5 e 7 dias de imersão (figura 34) a camada precipitada assume a forma de placas de dimensões razoáveis, fracamente aderentes à superfície do vidro a avaliar pela facilidade com que se destacam sem aplicação de esforço.

A placa apresenta uma relação Ca/P de 1,30 para 5 dias e de 1,44 para 7 dias. É provável que numa primeira etapa se tenha formado OCP (Ca/P=1,33) e que este vá gradualmente mudando para hidroxiapatite (Ca/P=1,67), existindo para 7 dias uma mistura dos dois.

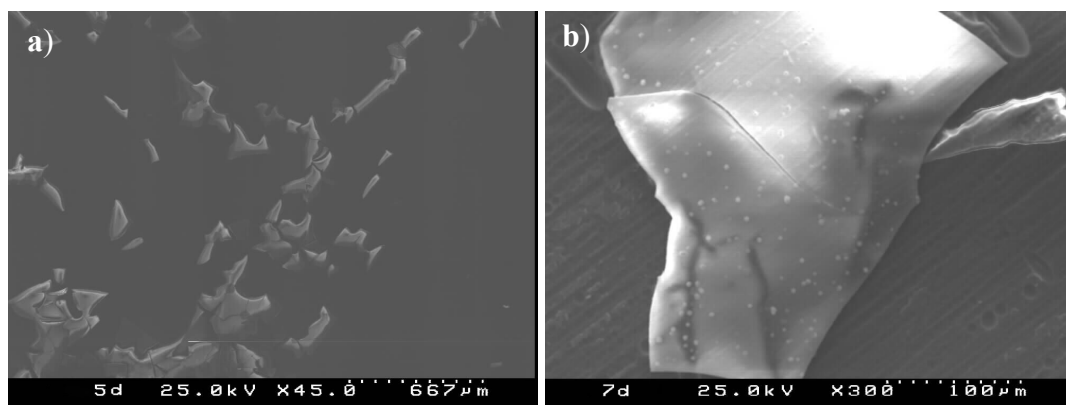


**Figura 32:** Imagens de SEM da superfície do vidro V20 com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão





**Figura 33:** Imagens de SEM da superfície do vidro V20 com 1 dia de imersão,  
a) ampliação 30 vezes b) ampliação 30.000 vezes.



**Figura 34:** Imagens de SEM da superfície do vidro V20 com: a) 5 dias de imersão; b) 7 dias de imersão

### 3.2.1 Vidro cerâmico V20C-840

O tratamento térmico efectuado a 840°C produziu um vidro cerâmico com um índice de cristalinidade, IC baixo (47% na tabela 13). O vidro cerâmico V20C-840 é constituído por uma fase cristalina de fosfato de cálcio e tem ainda presente uma grande quantidade de fase amorfa, aproximadamente 57% (tabela 13).

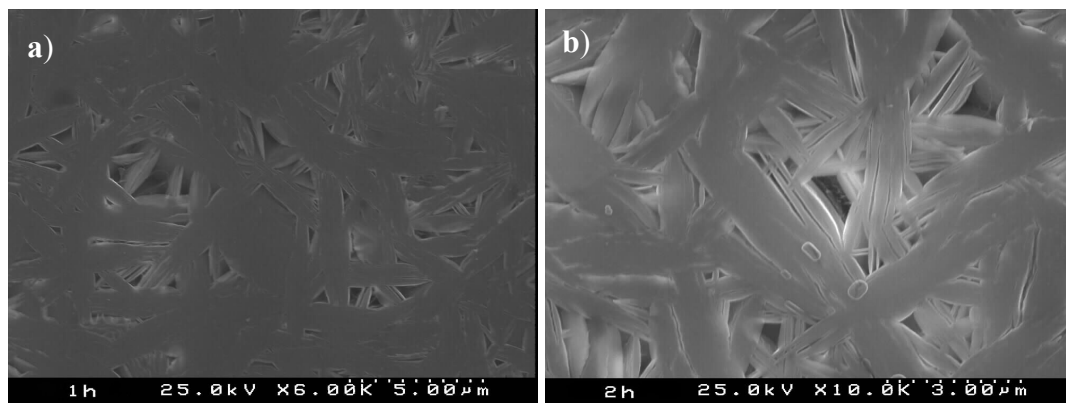
Nas primeiras horas de imersão (figura 35) podemos observar a dissolução do vidro, não se detectando formação de precipitados na superfície do material. A dissolução ocorre principalmente entre os cristais de fosfato de cálcio e é muito rápida, como se pode observar na figura 35a, que representa a superfície da amostra com 1 hora de imersão em SBF.

Com um dia de imersão (figura 36a) são visíveis pequenos precipitados, sendo que aos 5 dias de imersão (figura 36b) a quantidade desses depósitos aumenta consideravelmente.

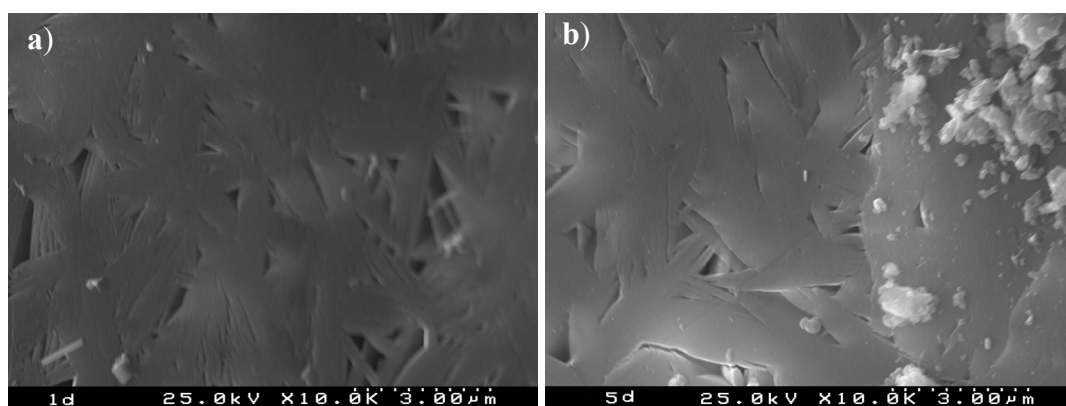
O vidro cerâmico com 7 dias de imersão apresenta ainda poucos precipitados e demasiado pequenos para se poder determinar a composição química por EDS. Aos 10 dias observa-se, no entanto, um aumento da quantidade e do tamanho dos precipitados formados (figura 37).

Com 20 dias de imersão (figura 38a) não se detectam alterações significativas e apenas no trigésimo dia de imersão (figura 38b) se observa claramente um precipitado formado na superfície, com aproximadamente 8 µm de largura. A análise por EDS deste precipitado, revela uma relação Ca/P de 1,32 próximo, da de um OCP (Ca/P=1,33).

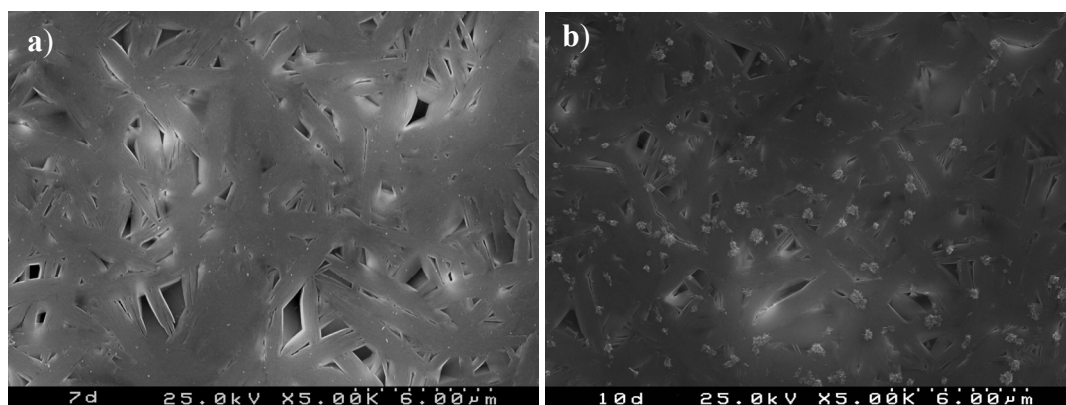
Para melhor compreender a natureza da camada precipitada e de maneira a obter uma espessura suficientemente representativa, foram efectuados ensaios com a duração de 5 meses, em que o SBF foi substituído mensalmente. Conseguiu-se precipitar uma grande quantidade de fosfato de cálcio na superfície conforme mostra a figura 39, em que uma parte do vidro cerâmico está parcialmente coberto pela camada. Esta apresenta-se fissurada, mas aparentemente não existe separação do substrato. Esta camada apresenta uma relação Ca/P de 1,60 aproximando-se da razão Ca/P da hidroxiapatite.



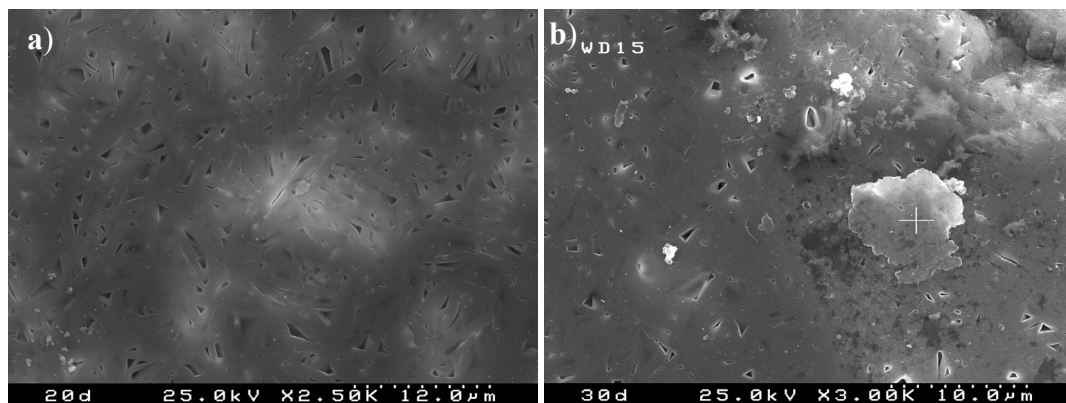
**Figura 35:** Imagens de SEM da superfície do V20C-840 com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão.



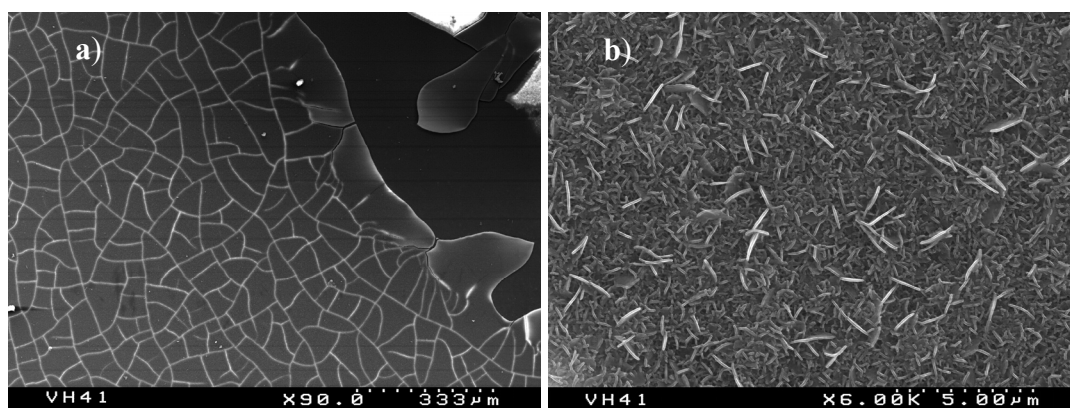
**Figura 36:** Imagens de SEM da superfície do V20C-840 com: a) 1 dia de imersão; b) 5 dias de imersão.



**Figura 37:** Imagens de SEM da superfície do V20C-840 com: a) 7 dias de imersão; b) 10 dias de imersão.



**Figura 38:** Imagens de SEM da superfície do V20C-840 com: a) 20 dias de imersão; b) 30 dias de imersão



**Figura 39:** Imagens de SEM da superfície do V20C-840 com 5 meses de imersão,  
a) ampliação 90 vezes b) ampliação 6.000 vezes.

### 3.2.2 Vidro cerâmico V20C-870

No tratamento térmico efectuado a 870°C produziu-se um vidro cerâmico com um IC de 64%, superior ao do vidro cerâmico V20C-840. O V20C-870 tem uma fase cristalina de fosfato de cálcio e uma fase amorfa que é aproximadamente 36% em peso. Esta última está presente em menor quantidade que no V20C-840.

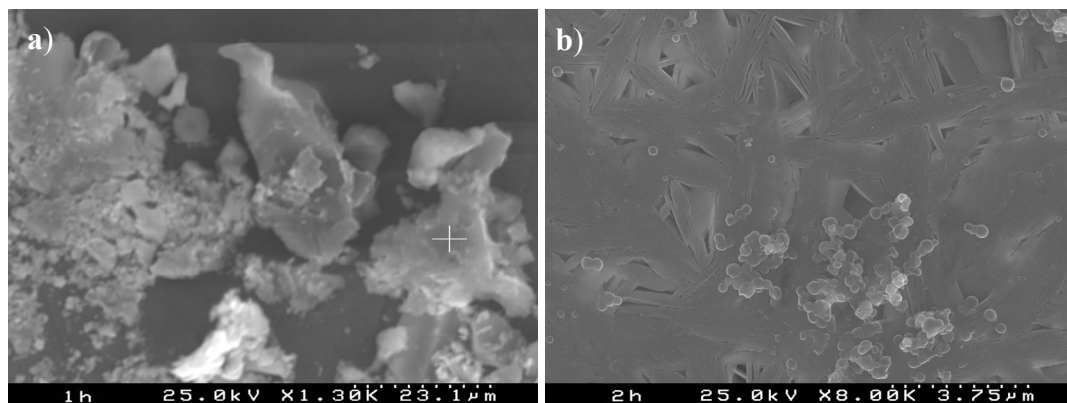
Nas primeiras horas de imersão (figura 40) houve dissolução do vidro e formação de depósitos de cálcio e de cloreto de cálcio que decorreu até ao primeiro dia. As formações de cloreto de cálcio são acidentais e podem ser atribuídas a uma má desionização da água (ultra pura) utilizada na preparação do SBF. O mesmo sucedeu na amostra de 1 dia de imersão (figura 41a).

A partir do 5º dia observou-se, pela primeira vez, a formação de pequenos nódulos de fosfato de cálcio na superfície do vidro com uma relação Ca/P de 1,34, típica de um OCP.

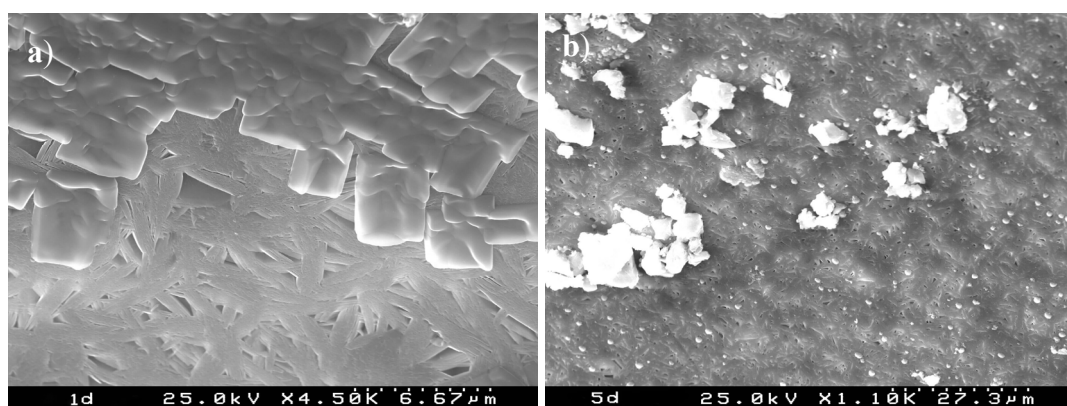
Com 7 dias e 10 dias de imersão a evolução da precipitação não foi significativa (figura 42). A relação Ca/P manteve-se estável em comparação com a determinada nos precipitados com 5 dias.

Ao fim de 20 e 30 dias (figura 43) de imersão não houve formação significativa de fosfatos de cálcio. A dificuldade de formação de uma camada é bem evidente, o que pode estar relacionado com a heterogeneidade das amostras, e com o facto de a fase amorfa não estará igualmente distribuída por toda a superfície da amostra. Com efeito, a maior quantidade de fase amorfa numa zona poderá iniciar o processo de dissolução e posterior precipitação da camada, ao lado de outra zona mais estável devido à maior quantidade da fase cristalina.

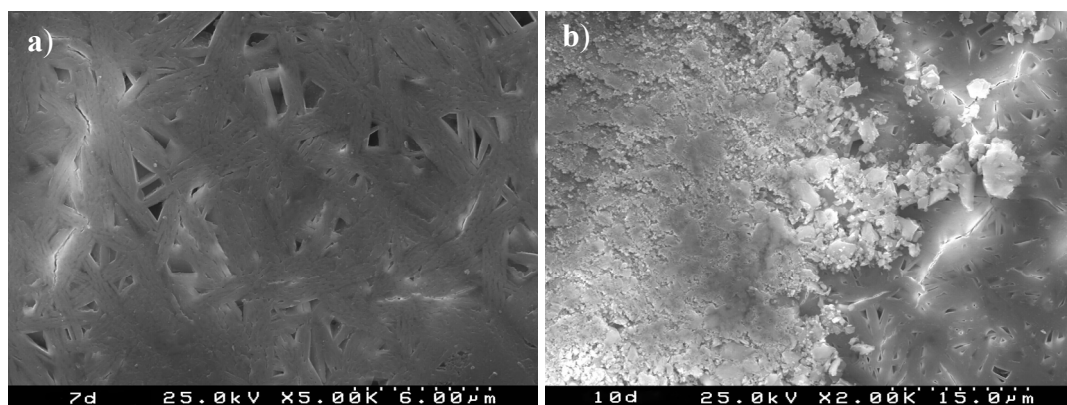
De maneira a obter uma camada suficientemente espessa, foram efectuados ensaios com 5 meses de imersão (figura 44) em que o SBF foi substituído mensalmente. O precipitado que cobre por completo a superfície do vidro têm uma razão Ca/P de 1,69 similar à da hidroxiapatite.



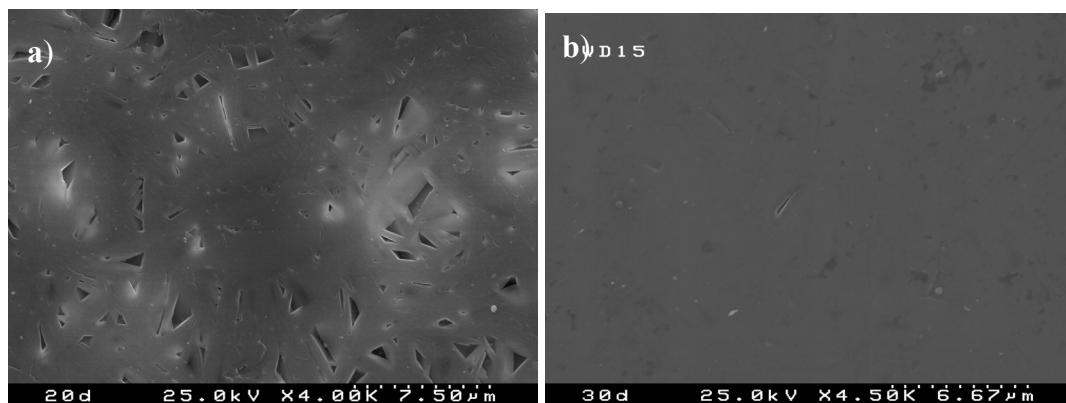
**Figura 40:** Imagens de SEM da superfície do V20C-870 com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão.



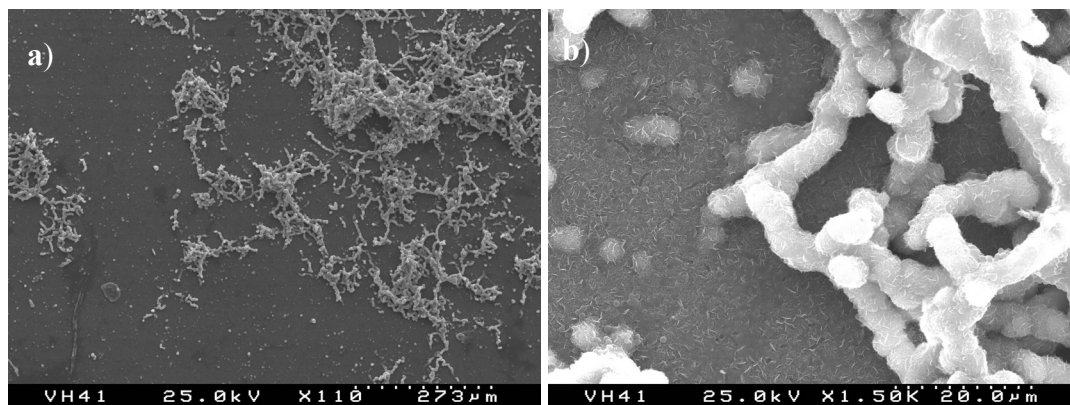
**Figura 41:** Imagens de SEM da superfície do V20C-870 com: a) 1 dia de imersão; b) 5 dias de imersão.



**Figura 42:** Imagens de SEM da superfície do V20C-870 com: a) 7 dias de imersão; b) 10 dias de imersão.



**Figura 43:** Imagens de SEM da superfície do V20C-870 com: a) 20 dias de imersão; b) 30 dias de imersão.



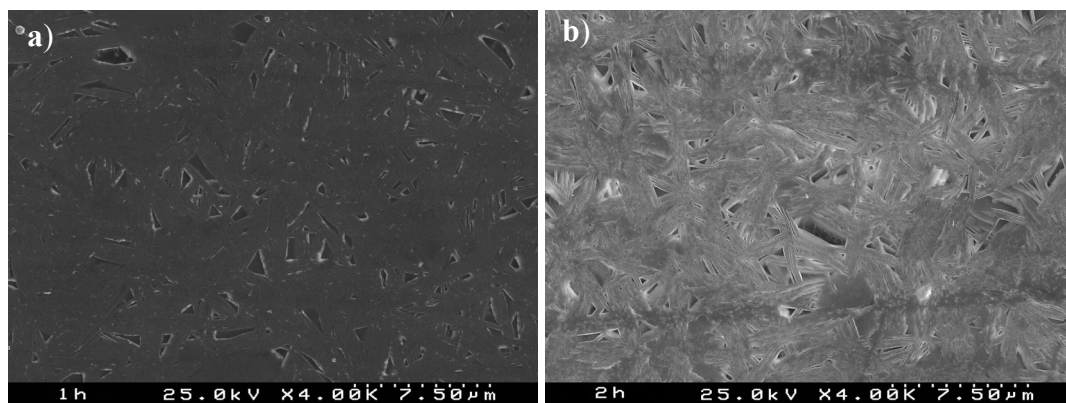
**Figura 44:** Imagens de SEM da superfície do V20C-870 com 5 meses de imersão,  
a) ampliação 110 vezes b) ampliação 1.500 vezes.

### 3.2.3 Vidro cerâmico V20C-890

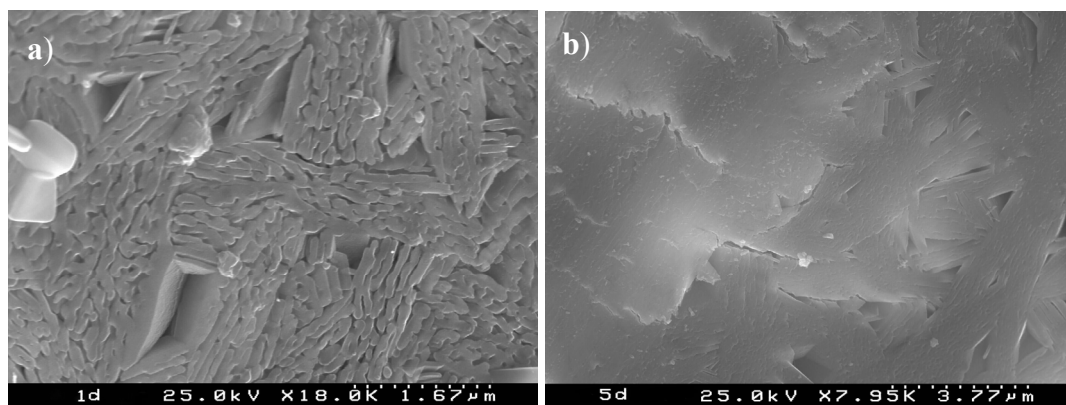
O tratamento térmico efectuado a 890°C produziu um vidro cerâmico com um IC de 75% superior ao dos vidros cerâmicos anteriores. O vidro cerâmico V20C-890 apresenta uma única fase de fosfato de cálcio, estando presente uma pequena quantidade de fase amorfa (25%).

Nos ensaios de imersão realizados até aos trinta dias apenas se observou a formação de fosfato de cálcio a partir do décimo dia e em muito pequena quantidade. Com 20 e 30 dias de imersão observa-se a presença de alguns precipitados pontuais.

As amostras com 5 meses de imersão (figura 49) formaram uma camada de fosfato de cálcio bastante quebradiça e com tendência a destacar-se. Mesmo com 5 meses de imersão a camada formada no vidro cerâmico V20C-890 não consegue cobrir totalmente a superfície do vidro.

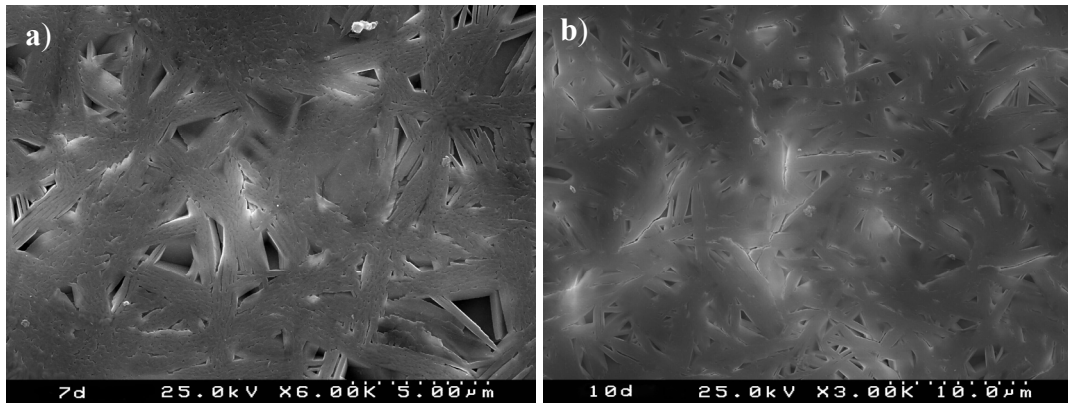


**Figura 45:** Imagens de SEM da superfície do V20C-890 com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão.

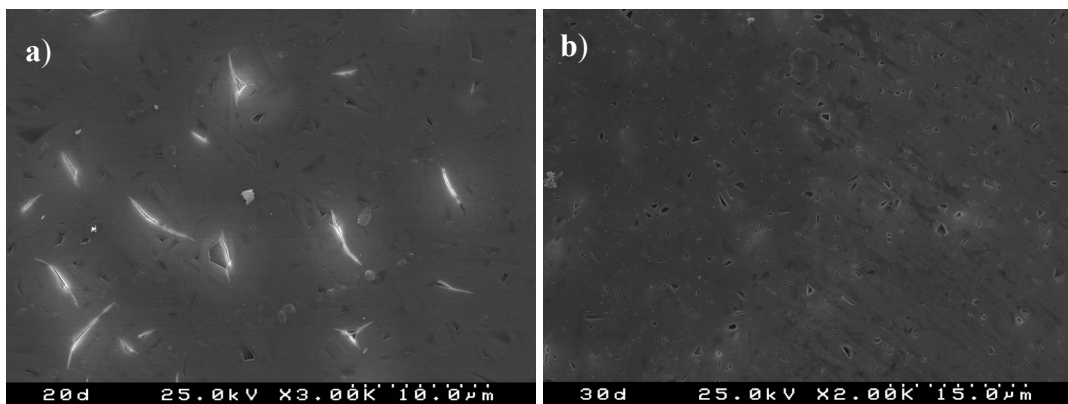


**Figura 46:** Imagens de SEM da superfície do V20C-890 com: a) 1 dia de imersão; b) 5 dias de imersão.

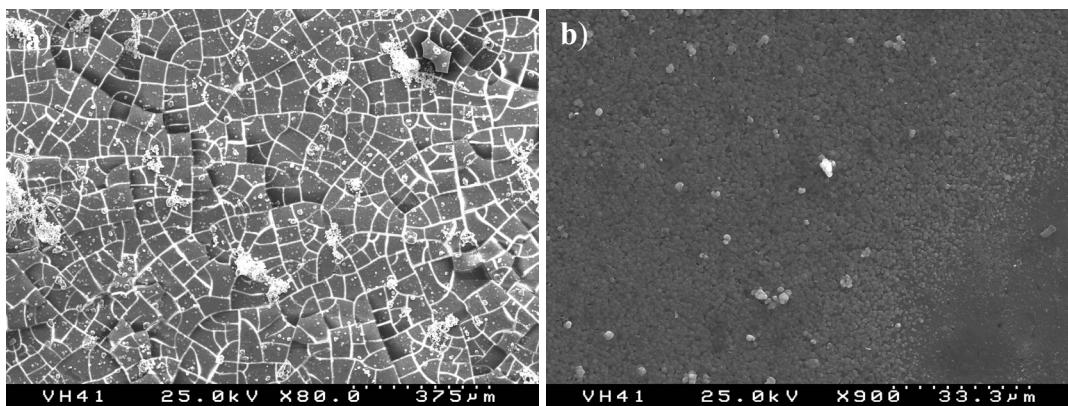




**Figura 47:** Imagens de SEM da superfície do V20C-890 com: a) 7 dias de imersão; b) 10 dias de imersão.



**Figura 48:** Imagens de SEM da superfície do V20C-890 com: a) 20 dias de imersão; b) 30 dias de imersão.



**Figura 49:** Imagens de SEM da superfície do V20C-890 com 5 meses de imersão,  
a) ampliação 80 vezes b) ampliação 900 vezes.

### 3.2.4 Vidro cerâmico V20C-910

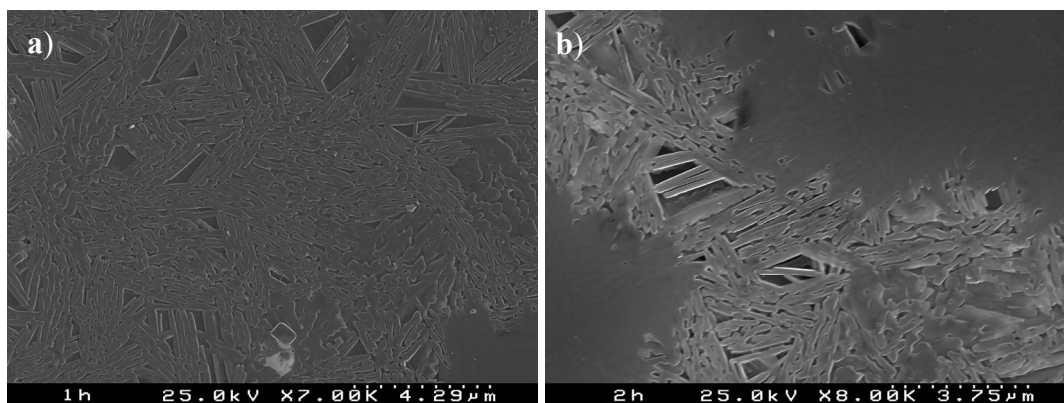
O vidro tratado a 910°C produziu o vidro cerâmico com o maior IC (84%) do grupo de vidros cerâmicos V20C estudados. Está ainda presente 16% de fase amorfa.

Na figura 50 pode-se observar que a fase vítrea tem maior dificuldade em se dissolver, em relação aos vidros cerâmicos anteriores.

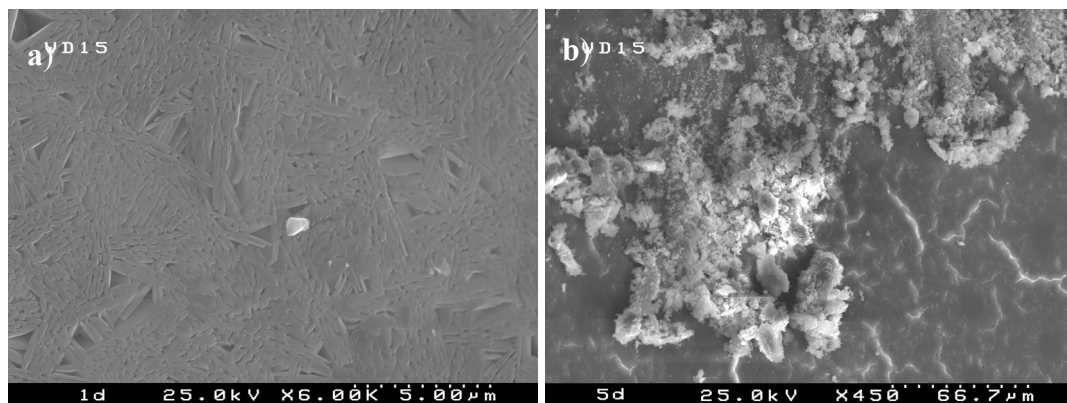
Durante os trinta dias de imersão em SBF em que ocorreu o ensaio não se detectou nenhuma formação de fosfato de cálcio. Mas ao fim de 5 meses de imersão formou-se uma grande placa de fosfato de cálcio com uma razão Ca/P de 1,50.

Em comparação com os outros vidros cerâmicos V20C, observa-se uma diminuição da quantidade de camada precipitada, que pode estar ligado à diminuição da quantidade de fase amorfa ainda presente no material.<sup>[16, 111-113]</sup>

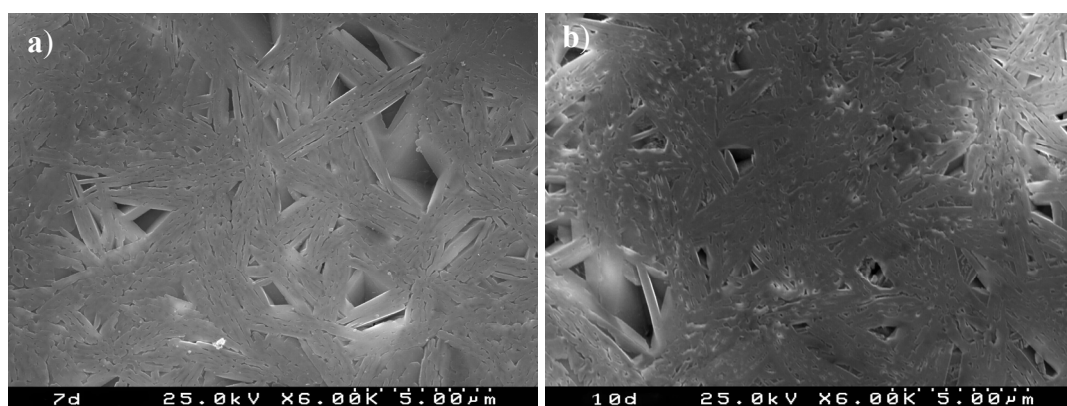
O efeito inibidor da cristalização na bioactividade *in vitro* deste tipo de materiais, também verificado noutros sistemas <sup>[114, 115]</sup>, pode transformar um vidro reactivo num material praticamente inerte <sup>[116]</sup>.



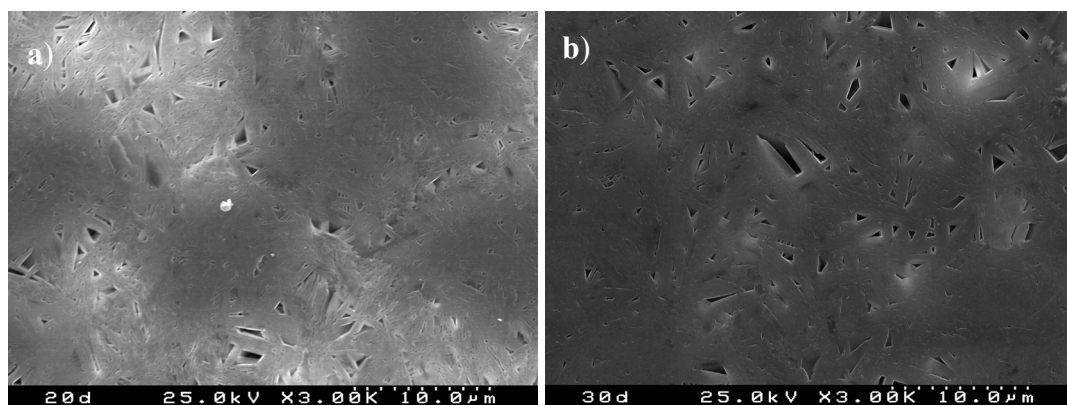
**Figura 50:** Imagens de SEM da superfície do V20C-910 com: a) 1 hora de imersão; b) 2 horas de imersão.



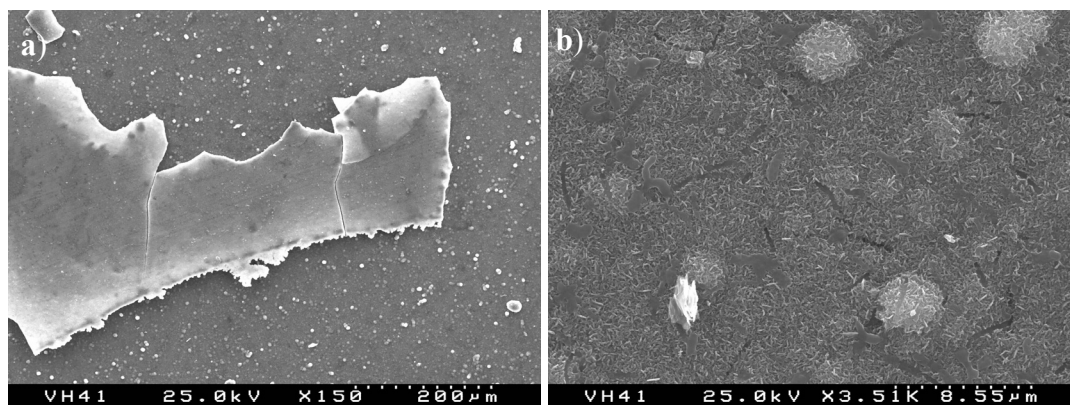
**Figura 51:** Imagens de SEM da superfície do V20C-910 com: a) 1 dia de imersão; b) 5 dias de imersão.



**Figura 52:** Imagens de SEM da superfície do V20C-910 com: a) 7 dias de imersão; b) 10 dias de imersão.



**Figura 53:** Imagens de SEM da superfície do V20C-910 com: a) 20 dias de imersão; b) 30 dias de imersão.

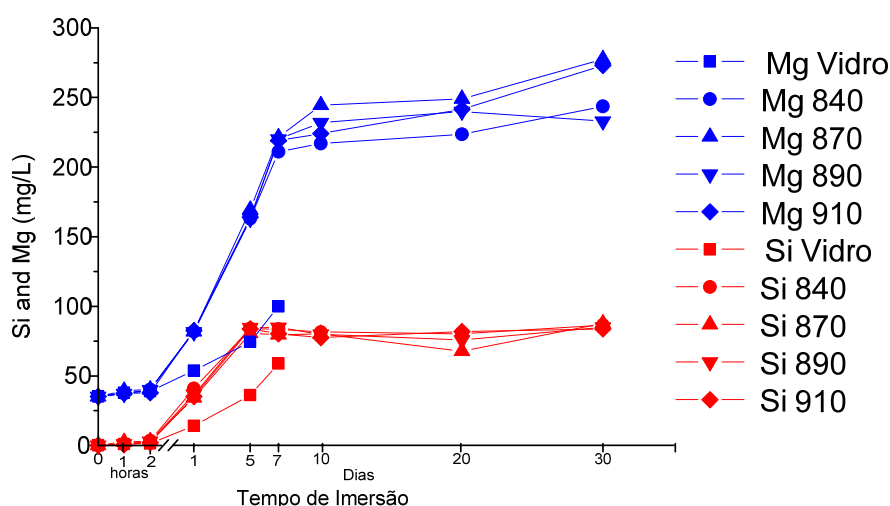
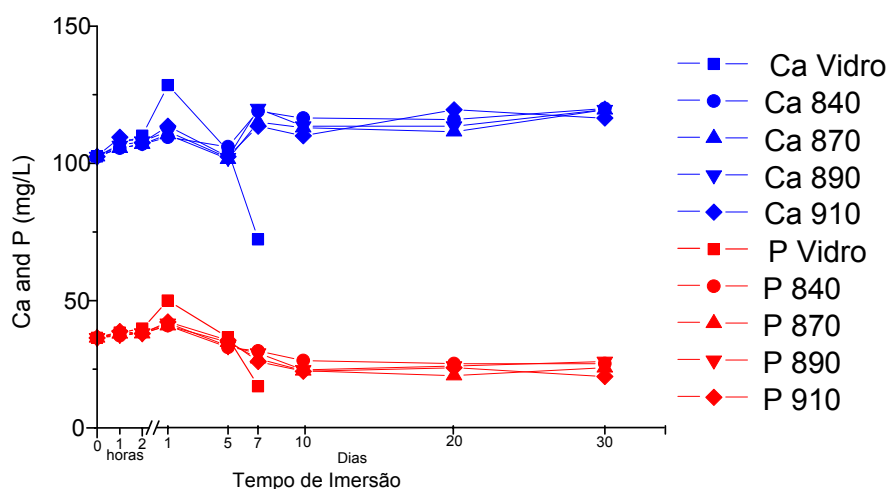


**Figura 54:** Imagens de SEM da superfície do V20C-910 com 5 meses de imersão,  
a) ampliação 150 vezes b) ampliação 3.510 vezes.

### 3.2.5 Análise das trocas iônicas entre a solução e o material

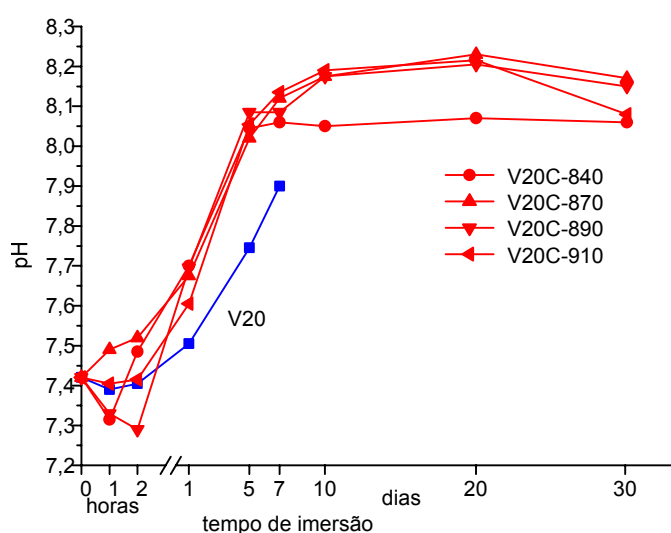
O vidro V20 (figura 55 e figura 56) apresenta uma dissolução de íons similar à do vidro V25 (figura 28). Em ambos os vidros V20 e V25, a dissolução de íons de fósforo e de cálcio é maior do que a dos respectivos vidros cristalizados.

Os vidros cerâmicos do V20 apresentam perfis de dissolução similares entre eles, de notar apenas um ligeiro decréscimo da concentração de fósforo na solução enquanto que o cálcio tem uma pequena tendência para aumentar.



Os vidros V20 cristalizados apresentam uma maior dissolução de silício e de magnésio que o vidro V25 cristalizado. No caso do íon magnésio, ao fim de 7 dias, a dissolução é cerca de 3 vezes superior à do vidro original (figura 56), e de 6 vezes superior em relação ao vidro V25 cristalizado (figura 28). A grande dissolução de Si e Mg a partir dos vidros cerâmicos V20C está directamente relacionada com a ausência de fases cristalinas de silicatos de magnésio, o que não acontece no vidro V25 cristalizado. De facto nos vidros cerâmicos formados a partir de V20, as únicas fases formadas são de fosfato de cálcio, enquanto que no V25C aparecem fases de fosfato de cálcio e de silicato de magnésio. O aprisionamento dos íons Si e Mg nas redes cristalinas organizadas torna a sua lixiviação mais difícil e explica a sua menor taxa de dissolução.

Na figura 57 representa-se a variação do valor de pH com o tempo de imersão para várias amostras de V20 cristalizadas e para o vidro V20 original.

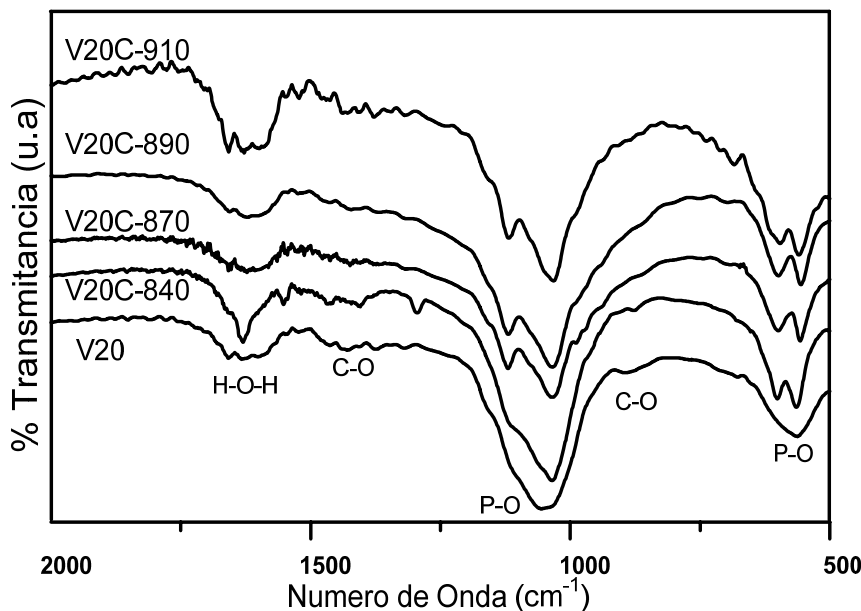


**Figura 57:** Valores de pH da solução de SBF após vários tempos de imersão do vidro V20 e dos respectivos vidros cerâmicos.

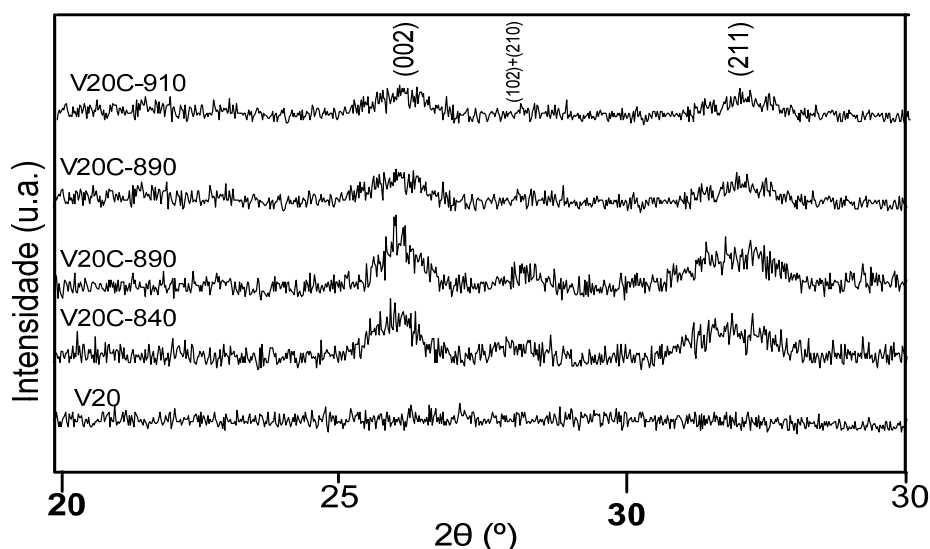
### 3.2.6 Análise da camada formada

A análise por espectroscopia de IV (figura 58) e por DRX de ângulo rasante (figura 59) ao precipitado formado no vidro após 7 dias de imersão, e no caso dos vidros cerâmicos V20C após 5 meses de imersão, confirmaram que o precipitado formado corresponde a uma hidroxiapatite carbonatada com baixo grau de cristalinidade. A baixa cristalinidade das camadas precipitadas pode estar ligada à grande quantidade de Mg libertado pelo vidro para a solução.<sup>[117-119]</sup>

Nos espectros de IV identifica-se o grupo carbonato que apresenta dois picos a 1450 e 1410  $\text{cm}^{-1}$  e um terceiro a 870  $\text{cm}^{-1}$  referente à vibração C-O. Os picos relativos à vibração da ligação P-O (bending) surgem a 560, 575 e 603  $\text{cm}^{-1}$  enquanto que a vibração P-O (stretch) absorve a 1060 e 1030  $\text{cm}^{-1}$ . Por fim a 1628  $\text{cm}^{-1}$  há um pico que identifica a presença de água adsorvida. O aumento da definição dos picos referentes as vibrações P-O para os vidros cerâmicos V20C é indicativo de um aumento na cristalinidade da camada precipitada.<sup>[41, 49, 110]</sup>



**Figura 58:** Espectro de infravermelho do vidro V20 com 7 dias de imersão e respectivos vidros cerâmicos com 5 meses de imersão.



**Figura 59:** Difractograma DRX de ângulo rasante do vidro V20 com 7 dias de imersão e dos respectivos vidros cerâmicos com 5 meses de imersão.

Na análise por DRX de ângulo rasante identificou-se a presença de uma apatite depositada sobre os vidros cerâmicos. A intensidade dos picos diminui à medida que a temperatura de patamar aumenta, uma vez que a quantidade de depósito formada também diminui com o aumento da temperatura (figura 39, figura 44, figura 49 e figura 54). A total ausência de picos no difractograma referente ao vidro após 7 dias de imersão em SBF, confirma a baixa cristalinidade da hidroxiapatite formada, identificado contudo por IV (figura 58) e observada por SEM (figura 34).<sup>[120]</sup>



### 3.3 Ensaios de “bioactividade” *In situ* por AFM

Para as análises *in situ* por AFM, foram utilizadas amostras iguais às usadas para os ensaios *in vitro* (capítulo 3. Bioactividade). A superfície da amostra foi coberta com algumas gotas de SBF e foram adquiridas imagens com 3 tempos diferentes (30 minutos, 1,5 horas e 4 horas).

Para os ensaios *in situ* foram escolhidas as duas amostras da composição V25 (vidro e vidro cerâmico V25C) e três amostras de V20 (vidro, vidros cerâmicos V20C-840 e V20C-910). As amostras utilizadas nos ensaios *in situ* foram posteriormente analisadas por SEM com EDS.

A dissolução dos vidros V25 e V20 mostrou uma evolução similar, mais ou menos uniforme (figura 60 e figura 61). No fim das 4 horas de imersão a superfície encontra-se substancialmente alterada, o vidro V25 (figura 60) apresenta muitas alterações na superfície, por sua vez no vidro V20 apresenta muito menos alterações significativas na sua superfície (figura 61). Comparando com os ensaios *in vitro* (figura 21 e figura 34b) pode concluir-se que o vidro V25 é ligeiramente mais reactivo.

A análise ao vidro V25C (figura 62) não permitiu obter imagens nitidez para retirar informações sobre alterações superficiais.

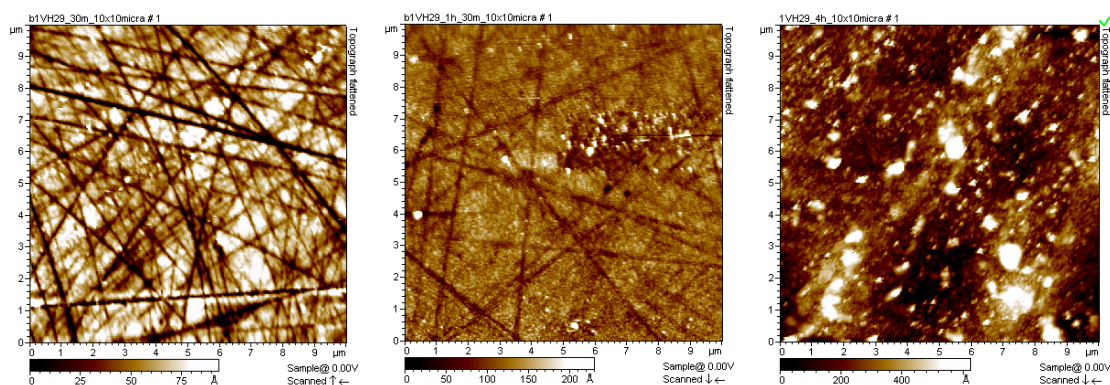
Nos vidros cerâmicos V20C-840 (figura 63) e V20C-910 (figura 64) consegue observar-se que no primeiro a dissolução é muito mais rápida que no segundo. Essa dissolução é tão rápida que a primeira imagem adquirida para o V20C-840 já apresenta grandes lacunas na superfície, correspondendo ao “desaparecimento” (dissolução) da fase vítrea.

A análise posterior por SEM e por EDS confirmou os resultados obtidos por AFM, embora não tenha sido possível identificar e quantificar através de EDS a composição química de nenhum precipitado formado.

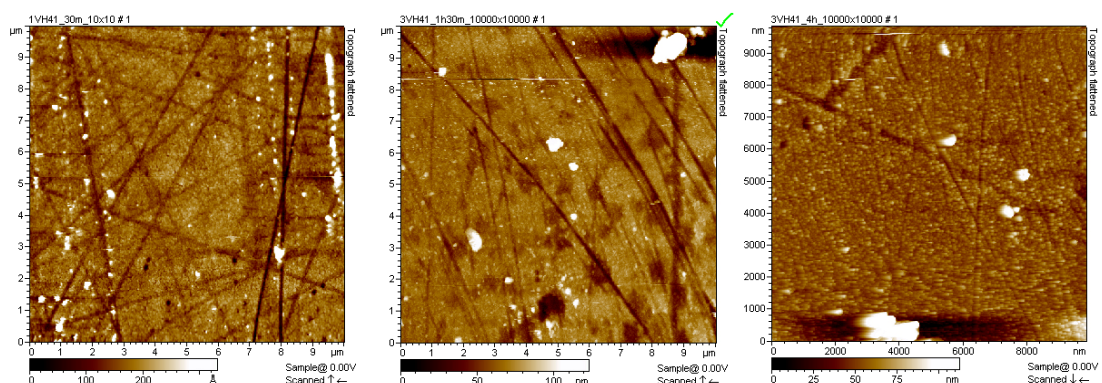
A utilização deste método para avaliar o comportamento *in situ* destes materiais foi apenas uma primeira abordagem, com o objectivo de obter informações adicionais em relação as ensaios *in vitro* sequenciais, apresentados nos pontos anteriores.

Verificou-se que os resultados obtidos não trouxeram acréscimo substancial às informações que foi possível obter com o método estático de abordagem sequencial.

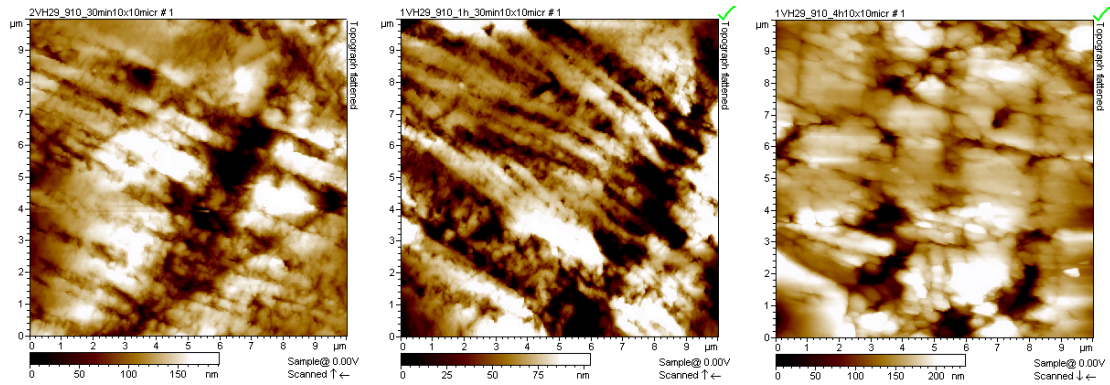
As principais lacunas na utilização deste método foram: o diminuto tempo de imersão (foram descritos tempos de imersão muito superiores por outros autores [37, 121]), a não existência de controlo de temperatura (esta deveria estar sempre a 37°C), o contacto da amostra com o SBF não foi feito por imersão mas sim cobrindo-se a superfície da amostra com umas gotas de SBF.



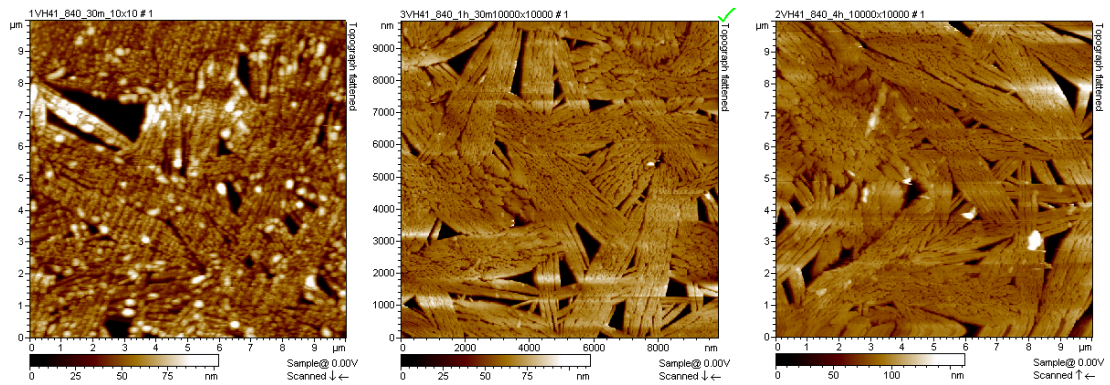
**Figura 60:** Imagens de AFM do vidro V25 com 30 minutos, 1,5 horas, 4 horas de imersão em SBF (da esquerda para a direita).



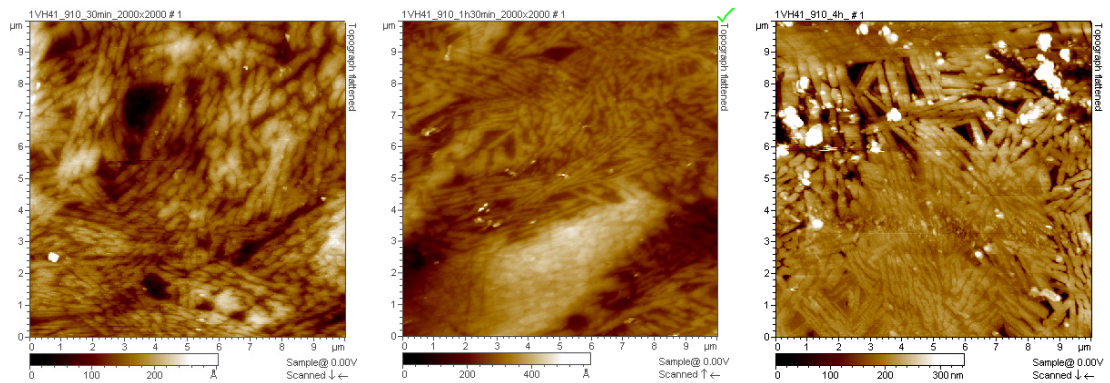
**Figura 61:** Imagens de AFM do vidro V20 com 30 minutos, 1,5 horas, 4 horas de imersão em SBF (da esquerda para a direita).



**Figura 62:** Imagens de AFM do vidro cerâmico V25C com 30 minutos, 1,5 horas, 4 horas de imersão em SBF (da esquerda para a direita).



**Figura 63:** Imagens de AFM do vidro cerâmico V20C-840 com 30 minutos, 1,5 horas, 4 horas de imersão em SBF (da esquerda para a direita).



**Figura 64:** Imagens de AFM do vidro cerâmico V20C-910 com 30 minutos, 1,5 horas, 4 horas de imersão em SBF (da esquerda para a direita).

### 3.4 Conclusões

Quer os vidros quer os vidros cerâmicos produzidos neste projecto apresentaram capacidade para induzir a precipitação de compostos de fosfato de cálcio à sua superfície, quando imersos em fluidos fisiológicos sintéticos, indicando que todos são potencialmente bioactivos, embora com taxas de dissolução diferentes.

Nos vidros V25 e V20 a formação do precipitado, que se verificou ser de hidroxiapatite, mostrou-se significativa ao fim de 7 dias de imersão, embora o vidro V25 apresente uma reactividade superficial *in vitro* superior à do vidro V20, a avaliar pela maior quantidade de precipitado formada. Por sua vez os vidros cerâmicos apenas formaram uma camada equivalente após 5 meses de incubação.

A cristalização dos vidros V25 e V20 levou a um decréscimo da bioactividade *in vitro* destes materiais, medida através da formação do depósito apatítico à sua superfície em SBF. No caso particular do vidro V20 a reactividade superficial dos vidros cerâmicos dele derivados varia na ordem  $V20C-840 > V20C-870 > V20C-890 > V20C-910$ , correspondendo ao aumento da cristalinidade das amostras. Verificou-se assim que do vidro base V20 com elevada reactividade superficial se passou, após cristalização, a vidros cerâmicos progressivamente menos reactivos, até ao limite da composição V20C-910 que se apresentou praticamente inerte, isto é, inatacada pelo líquido fisiológico. As diferenças de comportamento encontradas foram principalmente atribuídas às diferentes percentagens de fase vítrea existentes nos vários materiais. No entanto, o estado da superfície das amostras (rugosidade) poderá também ter influência na cinética de dissolução das estruturas superficiais dos materiais, sobretudo durante os estágios iniciais.

Embora não quantificável, a adesão dos precipitados apatíticos aos vidros cerâmicos é mais significativa que a adesão aos respectivos vidros-base. Enquanto que sobre os vidros se formam camadas sobrepostas facilmente destacáveis, nos vidros cerâmicos os precipitados de fosfato de cálcio crescem a partir dos buracos resultantes da dissolução do vidro residual distribuído em bolsas. Como resultado os precipitados ficam

mais intimamente ligados ao material-substrato, e o arrancamento da camada torna-se extremamente difícil.

Observa-se também, tanto por SEM como por AFM, que a fase vítrea é mais estável nas matrizes residuais dos vidros cerâmicos obtidos a maiores temperaturas de cristalização. Esta estabilidade pode ser originada pelo aumento relativo da quantidade de Si na fase vítrea, uma vez que os iões P, Ca e Mg são deslocados para a formação das fases cristalinas progressivamente mais representativas à medida que aumenta a temperatura de tratamento térmico dos vidros.

A camada formada nos vidros imersos em SBF foi identificada como uma hidroxiapatite carbonatada, embora no vidro cerâmico V25C apareça uma mistura de hidroxiapatite carbonatada e OCP. A morfologia dos precipitados e os valores da relação Ca/P nesses precipitados sugerem que, em todas as situações, deve formar-se OCP numa primeira fase, transformando-se em hidroxiapatite à medida que aumenta o tempo de imersão.

A utilização da técnica de microscopia de força atómica para o estudo da bioactividade de vidros e vidros cerâmicos, tal como foi realizado, revelou-se pouco produtiva e eficaz relativamente a outras técnicas mais comuns, designadamente a microscopia electrónica de varrimento. Por forma a rentabilizar as potencialidades deste ferramenta de análise será fundamental optimizar as condições experimentais de operação do equipamento.

### 3.5 Trabalhos Futuros

No final do trabalho realizado neste projecto ficaram por responder algumas questões que seria importante explorar com mais detalhe:

- A quantificação das fases presentes nos vidros cerâmicos: tendo em vista a importância da fase vítrea e das fases cristalinas na mineralização, será fundamental encontrar métodos mais expeditos que os actualmente disponíveis para a quantificação das fases.
- A quantificação da adesão das camadas: os métodos disponíveis são apenas indicados para superfícies completamente planas. No caso presente a quantificação da adesão das camadas precipitadas continua a ser extremamente difícil devido à irregularidade das camadas e à natureza específica da superfície dos vitrocerâmicos.
- A optimização das condições de análise na microscopia de força atómica: esta técnica tem grandes potencialidades, mas é necessário que se faça ainda algum trabalho ao nível do controlo de temperatura, tempos de ensaio e fluxo de líquido.

No futuro, além da avaliação das propriedades mecânicas dos materiais obtidos, será muito importante realizar ensaios em presença de células para depois poder evoluir para ensaios *in vivo* e avaliar a sua real capacidade bioactiva.



4 *Bibliografia*





1. L.L. Hench, *Bioceramics*. J. Am. Ceram. Soc., 1998. **81**: p. 1705-1728.
2. L.L. Hench, *A forecast for the future*. Biomaterials, 1998. **19**: p. 1419.
3. L.L. Hench, *Bioceramics: from concept to clinic*. J. Am. Ceram. Soc., 1991. **74**: p. 1487-510.
4. I.M.B. Leonor, *Development of Bioactive Starch Based Composites and Novel Coating Methodologies to Produce Bioactive Layers on Polymeric Surfaces*. 2001, Departamento de Engenharia de Polimeros, Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
5. L.L. Hench and J. Wilson, *Surface-Active biomaterials*. Science, 1984. **226**: p. 630-636.
6. W. Cao and L.L. Hench, *Bioactive Materials*. Ceramics international, 1996. **22**: p. 493-507.
7. G.A. Rodan, *Introduction to bone biology*. Bone, 1992. **13**: p. S3-S6.
8. A.S. Postner, *The mineral bone*. clinical Orthopedics, 1985. **200**: p. 87.
9. C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani, T. Yamamuro, *Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body*. Journal of Biomedical Materials Research, 25. **26**: p. 1419-1432.
10. T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, *Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass ceramic A-W*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. **24**: p. 331-343.
11. H. Aoki, *Science and medical applications of hydroxyapatite*. japanese Assotiation of Apatite Science. 1991: Takayama Press System Centre Co. Inc.
12. W. Bonfield, J. Bowman, M. D. Grynpas, *Composite Materials for use in Orthopaedics*. 1981, 8032647: Uk.
13. L.L. Hench and J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*. 1993: World Scientific.
14. T. Kokubo, H. Hushitani, S. Salla, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in Bioactive glass-ceramic*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. **24**: p. 721-734.
15. J.M.M.d. Oliveira, *Vidros cerâmicos do sistema MgO-3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> para implantologia Óssea*. 1994, Departamento de Engenharia de Materiais e do Vidro, Universidade de Aveiro: Aveiro.
16. C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, *Mechanism of apatite formation on CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses in simulated body fluid*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1992. **143**: p. 84-92.
17. O. Peitl, E.D. Zanotto, and L.L. Hench, *Highly Bioactive P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> Glass-ceramics*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. **292**: p. 115-126.
18. D. Tadic and M. Epple, *A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone*. Biomaterials, 2004. **25**: p. 987-994.

19. L.L. Hench, *Bioceramics: from concept to clinics*. J. Am. Ceram. Soc., 1991. **74**: p. 1487-1510.
20. C.Y. Kim, A.E. Clark, and L.L. Hench, *Early stages of calcium phosphate films on silicate glasses*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1989. **113**: p. 195-202.
21. I. Rehman, L.L. Hench, W. Bonfield, and R. Smith, *Analysis of surface layers on bioactive glasses*. Biomaterials, 1994. **15**: p. 865-870.
22. C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, *Mechanism of apatite formation on CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1992. **119**: p. 290-296.
23. T. Kokubo, *Surface chemistry of bioactive glass-ceramics*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1990. **120**: p. 138-151.
24. T. Kokubo, *Bioactive glass-ceramics: Properties and applications*. Biomaterials, 1991. **12**(155-163): p. artigo paula.
25. T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, *Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid*. Journal of materials science: Materials in medicine, 1992. **3**: p. 79-83.
26. O.H. Andersson, K.H. Karlsson, and K. Kangasniemi, *Calcium Phosphate formation at the surface of bioactive glass in vivo*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1990. **119**: p. 290-296.
27. O.H. Andersson, G. Liu, K.H. Karlsson, L. Niemi, J. Miettinen, and J. Juhanaja, *In vivo Behaviour of glasses in the SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> system*. Journal of materials science: Materials in medicine, 1990. **1**: p. 219-227.
28. O.H. Andersson and K.H. Karlsson, *On the bioactivity of silicate glass*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1991. **129**: p. 145-151.
29. P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakinishi, N. Soga, T. Nakamura, and T. Yamamuro, *Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel*. Journal of materials science: Materials in medicine, 1993. **4**: p. 127-131.
30. P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, and N. Soga, *Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid*. Journal of American Ceramic Society, 1992. **75**(8): p. 2094-97.
31. J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes, *Effects of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 371-379.
32. A.J. Salinas, J. Roman, M. Vallet-Regi, J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes, *In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO.SiO<sub>2</sub>-CaO.2SiO<sub>2</sub> system*. Biomaterials, 2000. **21**(3): p. 251-257.
33. J. Roman, A.J. Salinas, M. Vallet-Regi, J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes, *Role of acid attack in the in vitro bioactivity of a glass-ceramic of the 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO.SiO<sub>2</sub>-CaO.2SiO<sub>2</sub> system*. Biomaterials, 2001. **22**(14): p. 2013-2019.
34. T. Kokubo, *Bioactivity of glasses and glass ceramics*. In Bone-Bonding - Reed Healthcare Communications, Leiderdorp, 1992. **31**.

35. H.L.L. W. Cao, *Bioactive materials*. Ceramics International, 1986. **22**: p. 493-507.
36. K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y. Kotoura, and M. Oka, *Bone bonding Ability of P2O5- free CaO.SiO2 Glasses*. Journal of Biomedical Materials Research, 1991. **25**: p. 357-365.
37. I.B. Leonor, A. Ito, K. Onuma, N. Kanzaki, and R.L. Reis, *In vitro bioactivity of starch thermoplastic/hydroxyapatite composite biomaterials: an in situ study using atomic force microscopy*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 579-585.
38. P.N.D. Aza, Z.B. Luklinska, C. Santos, F. Guitian, and S.D. Aza, *Mechanism of bone-like formation on a bioactive implant in vivo*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 1437-1445.
39. L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, and T.K. Greenlee, *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. Journal of Biomedical Materials Research, 1971. **5**(6): p. 117.
40. M. Vallet-Regí, A.M. Romero, C.V. Ragel, and R.Z. LeGeros, *XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of na apatite-like layer on sol-gel glasses*. Journal of Biomedical Materials Research, 1999. **44**: p. 416-421.
41. M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, and A.J. Salinas, *Glasses with Medical applications*. Journal of Inorganic Chemistry, 2003: p. 1029-1042.
42. M. Vallet-Regí, D. Arcos, and J. Pérez-Pariente, *Evolution of porosity during in vitro hydroxycarbonate apatite growth in sol-gel glasses*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**: p. 23-28.
43. M. Vallet-Regí, A. Rámila, S. Padilla, and B. Muñoz, *Bioactive glasses as accelerators of apatite bioactivity*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **66**: p. 580-585.
44. W. Pannhorst, *Glass ceramics: State-of-the-art*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1997. **219**: p. 198-204.
45. W. Höland and G. Beall, *Glass-Ceramic Technology*. 2002: The American Ceramic Society.
46. G.E. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, and R.A. Condrate, *Forming methods for apatite prothesis*. Journal of Biomedical Materials Research, 1969. **3**: p. 683-685.
47. J.P. LeGeros, M.H. Taheri, and G. Quirolgico, *Formation and stability of apatite: Effects of some cationic substitutes*. Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Congress on Phosphorous Compounds, 1980. **Boston**: p. 41-53 and 89-103.
48. R.Z. LeGeros, R. Kijkowska, and J.P. LeGeros, *Formation and trasformation of octacalcium phosphate OCP*. Scanning Electron Micro, 1984. **4**: p. 1771-1777.
49. R.Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Monographs in Oral Science, ed. H.M. Meyers. Vol. 15. 1991: Karger.
50. I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, and M. Vallet-Regí, *Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO-SiO2 sol-gel glass*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**: p. 191-199.

51. E. Verné, E. Bona, E. Angelini, F. Rosalbino, and P. Appendino, *Correlation Between Microstructure and Properties of Biocomposite Coatings*. Journal of European Ceramic Society, 2002. **22**: p. 2315-2323.
52. M. Wang, *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 2133-2151.
53. O. Peitl, R.L. Oréfice, L.L. Hench, and A.B. Brennan, *Effect of the crystallization of bioactive glass reinforcing agents on the mechanical properties of polymer composites*. Materials Science and Engineering A, 2004. **372**: p. 245-251.
54. L.L. Hench, H.A. Paschall, W.C. Allen, and G. Piotrowski, *Interfacial behaviour of ceramics implants*. Natl Bur Stand Spec Publ, 1975. **415**: p. 19-35.
55. T. Yamuro, L.L. Hench, and J. Wilson, *Calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics*. Handbook of bioactive ceramics. Vol. II. 1990: CRS Press, Boca Raton, FL.
56. S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Suganuma, and A.P. Tomsia, *Bioactive glass coatings for Orthopedic metallic implants*. Journal of The European Ceramic Society, 2003. **23**: p. 2921-2930.
57. D.C. Greenspan and L.L. Hench, *Chemical and mechanical behaviour of bioglass-coated alumina*. Journal of Biomedical Materials Research, 1976. **10**(4): p. 503-509.
58. J.A. Helsen, J. Proost, J. Schrooten, G. Timmermans, E. Brauns, and J. Vandertraeten, *Glasses and Bioglasses: Synthesis and Coatings*. Journal of European Ceramic Society, 1997. **17**: p. 147-152.
59. F. Horgan and B.J. Meenan, *Effects of substrate Morphology on Osteoblastic Responce to thin film Calcium Phosphate Coatings*. Bioceramics, 2003. **15**: p. 433-436.
60. C.V. Brovarone, E. Verné, A. Krajewski, and A. Ravaglioli, *Graded coatings on ceramic substrates for biomedical applications*. Journal of The European Ceramic Society, 2001. **21**: p. 2855-2862.
61. H.R. Stanley, M.B. Hall, A.E. Clark, C.J. King, L.L. Hench, and J.J. Berte, *Using 45S5 Bioglass<sup>®</sup> cones as endosseous ridge maintenance implantes to presente alveolar ridge resorption: a 5-year evaluation*. International Journal of Oral Maxillofacial Implants, 1997. **12**: p. 95-105.
62. T.B. Lovelace, J.T. Melloning, R.M. Meffert, A.A. Jones, P.V. Nummikoski, and D.L. Cochran, *Clinical evaluation of bioactive glass in the treatement of periodontal osseous defects in humans*. Journal of Periodontol, 1998. **69**: p. 1027-35.
63. S.J. Froum, M.A. Weinberg, and D. Tarnow, *Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects*. Journal Periodontal, 1998. **69**: p. 698-709.
64. J.R. Jones, P. Sepulveda, and L.L. Hench, *Dose-Dependent Behavior of Bioactive Glass Dissolution*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **58**: p. 720-726.

65. P. Sepulveda, J.R. Jones, and L.L. Hench, *In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **61**(2): p. 301-11.
66. P. Stoor, E. Soderling, and J.L. Salonen, *Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms*. Acta Odontol Scand, 1998. **56**: p. 161-5.
67. I. Allan, H. Newman, and M. Wilson, *Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria*. Biomaterials, 2001. **22**: p. 1683-1687.
68. B.J. Tai, M.Q. Du, H. Jiang, J.P. Zhong, D.C. Greenspan, and A.E. Clark, *Anti-gingivitis efficacy of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMin) particulate*. Journal of Dent Res, 2004. **83**: p. 135-8.
69. J. Wilson, A.E. Clark, E. Douek, J. Kriegger, W.K. Smith, and J.S. Zimet, *Clinical Applications of Bioglass Implants*, in *Bioceramics*, O.H. Andersson and A. Yli-Urpo, Editors. 1994, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 415-422.
70. J. Wilson, A. Yli-Urpo, and R.P. Happonen, eds. *Bioactive Glasses: Clinical applications*. An introduction to Bioceramics, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1993, World Scientific: Londres. 63-73.
71. K. Lobel, *In Clinical Performance of Skeletal Prostheses*, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1995, Londres: Chapman and Hall. 375-382.
72. H.R. Stanley, A.E. Clark, and L.L. Hench, *In Clinical Performance of Skeletal Prostheses*, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1995, Londres: Chapman and Hall. 255-270.
73. U.M. Gross, C. Muller-Mai, and C. Voigt, eds. *Ceravital Bioactive Glass-Ceramics*. An introduction to Bioceramics, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1993, World Scientific: Londres. 105-123.
74. R. Reck, *Bioactive glass-ceramics in ear surgery: nimal studies and clinical results*. Laryngoscope, 1994. **2**(2): p. suppl. 23, 1-54.
75. W. Holand and W. Vogel, eds. *Machinable and Phosphate Glass-ceramics*. An introduction to Bioceramics, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1993, World Scientific: Londres. 105-123.
76. T. Yamamuro, J. Shikata, H. Okumuro, T. Kitsugi, Y. Kakutani, T. Matsui, and T. Kokubo, *Artificial bone for use as a bone prosthesis*. Progress in Artificial Organs, ed. K. Atsumi, M. Maekawa, and K. Ota. 1984, Cleveland: ISAO Press OH. 810-814.
77. K. Ono, T. Yamamuro, T. Nakamura, Y. Kakutani, T. Kitsugi, K. Hyakuna, T. Kokubo, M. Oka, and Y. Kotoura, *Apatite-wollastonite containing glass-ceramic-fibrin mixtures as bone defect filler*. Journal of Biomedical Materials Research, 1988. **22**: p. 869-885.
78. T. Yamamuro, *A/W Glass-ceramic: Clinical applications*. An introduction to bioceramics, ed. L.L. Hench and J. Wilson. 1993, Londres: World Scientific. 89-103.
79. C.A. van Blitterswijk, S.C. Jesseling, J.J. Grote, H.K. Korerte, and K. Groot, *The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: a study of retrieved human*

- middle ear implants*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. **24**: p. 433-453.
80. P.N. Galgut, I.M. Waite, and S.M.B. Tinkler, *Histological investigation of the tissue response to hydroxyapatite used as an implant material in periodontal treatment*. Clin Mater, 1990. **6**: p. 105-121.
81. R.N. Downes, S. Vardy, T.E. Tanner, and W. Bonfield, *Hydroxyapatite-polyethylene composite in orbital surgery*, in *Bioceramics 4*, W. Bonfield, G.W. Hastings, and K.E. Tanner, Editors. 1991, Butterworth-Heinmann Ltd: Oxford, London. p. 23-246.
82. *do Ingles Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy, Tradução retirada de NP ISO 10478:2001 (Ed.1)*.
83. I.M.B. Leonor, *Development of Bioactive Starch Based Composites and Novel Coating Methodologies to Produce Bioactive Layers on Polymeric Surfaces*, in *Departamento de Engenharia de Polimeros*. 2001, Escola de Engenharia da Universidade do Minho.
84. T. Kokubo, S. Ito, S. Sakka, and T. Yamamuro, *Formation of a high-strength bioactive glass-ceramic in the system MgO-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>*. Journal of Materials Science, 1986. **21**: p. 536.
85. J.M.M.d. Oliveira, *Desenvolvimento de vidros e de vidros cerâmicos sílico-fosfatados com elevado teor de alcalinoterrosos para aplicações biomédicas*, in *Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro*. 2000, Universidade de Aveiro.
86. J.M. Oliveira, R.N. Correia, M.H. Fernandes, and J. Rocha, *Influence of the CaO/MgO ration on the structure of phase-separated glasses: a solid state <sup>29</sup>Si and <sup>31</sup>P MAS NMR study*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. **265**: p. 221-229.
87. S. Agathopoulos, M.C. Ferro, J.Y. Xu, J.M. Oliveira, P.A.A.P. Marques, R.N. Correia, and M.H.V. Fernandes, *Structural Interpretation of the In Vitro Reactivity of SiO<sub>2</sub>-MgO-Na<sub>2</sub>O Glasses*. Key Engineering Materials, 2002. **240-242**: p. 217-220.
88. D. Pereira, S. Cachinho, M.C. Ferro, and M.H.V. Fernandes, *Surface Behaviour of High MgO-containing glasses of the Si-Ca-P-Mg system in a synthetic physiological fluid*. Journal of The European Ceramic Society, 2004. **24**: p. 3703.
89. S. Krimm and A.V. Tobolsky, *Quantitative x-ray studies of order in amorphous and crystalline polymers. Quantitative x-ray determination of crystallinity in polyethylene*. Journal of Polymer Science, 1951. **7**(1): p. 57-76.
90. F.H. Chung and D.K. Smith, *Industrial application of X-ray Diffraction*. 1998, Darien, Illinois, USA: Marcel Dekker. 496-497.
91. S.M. Ohlberg and D.W. Strickler, *Determination of percent crystallinity of partly devitrified glass by X-ray diffraction*. Journal of American Ceramic Society, 1962. **45**(6): p. 170-171.
92. L. Cervinka and J. Dusil, *Determination of crystallinity in crystallized glasses by X-ray diffraction*. J. Non-Cryst Solids, 1976. **21**: p. 125-136.

93. A.M. Russak, *Quantitative analysis of nepheline glass-ceramics by X-ray diffraction*. Journal of American Ceramic Society, 1974. **57**(11): p. 500-501.
94. D.W. Tomlin, D.B. Sullenger, and J.S. Cantrell, *Quantitative powder X-ray diffraction analysis of the partly devitrified glass by X-ray diffraction*. Powder Diffract., 1993. **8**(1): p. 29-35.
95. J.P. Williams, G.B. Carrier, H.J. Holland, and F.J. Farncomb, *The determination of the crystalline content of glass-ceramics*. Journal of Materials Science, 1967. **2**: p. 513-520.
96. F.H. Chung, *Quantitative interpretation of X-ray diffraction patterns of mixtures. I. Matrix-flushing method for quantitative multicomponent analysis*. Journal of Applied Crystallography 1974. **7**: p. 519-525.
97. H.S. Kim, *Quantitative determination of crystalline and amorphous phases in glass-ceramics by x-ray diffraction analysis*. B. Ceram. Trans. J., 1989. **88**: p. 21-25.
98. H.M. Rietveld, *The crystal structure of some alkaline earth metal uranates of the type M<sub>3</sub>UO<sub>6</sub>*. Acta Cryst, 1966. **20**: p. 508.
99. L. Lutterotti and P. Scardi, *Simultaneous structure and size-strain refinement by the Rietveld method*. J. Appl. Cryst., 1990. **23**: p. 246-252.
100. A.L. Bail, *Modelling the Silica Glass Structure by the Rietveld Method*. J. Non-Cryst. Solids, 1995. **183**: p. 39-42.
101. J.A.L. Viera, J. Ibarra, and L.M. Torres-Martínez, *Análisis Microestructural de un vitrocerámico empleando el método rietveld*. Ciencia UANL, 2005. **III**(1).
102. P.K. Klug and L.E. Alexander, *X-Ray Diffraction Procedures*. 1974: John Wiley & Sons.
103. N.A.F. Almeida and M.H.V. Fernandes, *Effect of glass ceramic crystallinity on the formation of simulated apatite layers*. Materials Science Forum III, 2005: p. 1039.
104. C.M. Queiroz, S. Agathopoulos, J.R. Frade, and M.H.V. Fernandes, *Network connectivity and bio-mineralization of 0.45SiO<sub>2</sub>-(0.45-x)MgO-xK<sub>2</sub>O-0.1(3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)*. Advanced materials Forum II: Materials Science Forum, 2004. **455-456**: p. 383-387.
105. T. Kokubo, *Bioactive glass-ceramics: Properties and applications*. Biomaterials, 1991. **12**: p. 155-163.
106. B. Yu, K. Liang, and S. Gu, *Effect of the microstructure on the mechanical properties of CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO-F glass ceramics*. Ceramics international, 2003. **29**: p. 695-698.
107. T. Kasuga, M. Sawada, M. Nogami, and Y. Abe, *Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses*. Biomaterials, 1999. **20**: p. 1415-1420.
108. X. Chen, L.L. Hench, D. Greenspan, J. Zhong, and X. Zhang, *Investigation on phase separation, nucleation and crystallization in bioactive glass-ceramics containing fluorophlogopite and fluorapatite*. Ceramics international, 1998. **24**: p. 401-410.



109. J.M.F. Navarro, *El Vidrio*. 2ed ed. 1991, Madrid: C.S.I.C.
110. J.C. Elliot, *Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates*. Studies in Inorganic Chemistry. Vol. 18. 1994: Elsevier.
111. P. Li, Q. Yang, and F. Zhang, *The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro*. Journal of materials science: Materials in medicine, 1992. **3**: p. 452-456.
112. S. Padilla, J. Romám, A. Carenas, and M. Vallet-Regí, *The influence of the phosphorus content on the bioactivity of sol-gel glass ceramics*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 475-483.
113. M. Brink, T. Turunem, R.-P. Happonen, and A. Yli-Urpo, *Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O-MgO-CaO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>*. Journal of Biomedical Materials Research, 1997. **37**: p. 114-121.
114. P. Guanabara.Jr, *Bioactivity study of glass-ceramics with various crystalline fractions obtained by controlled crystallization* Materials Science and Engineering 2004. **24**: p. 689-691.
115. O.P. Filho, G.P. LaTorre, and L. Hench, *Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5*. Journal of Biomedical Materials Research, 1996. **30**: p. 509-514.
116. H.A. Elbatal, M.A. Azooz, E.M.A. Khalil, A.S. Monem, and Y.M. Hamdy, *Characterization of some bioglass-ceramics*. Materials Chemistry and Physics, 2003. **80**: p. 599-609.
117. Y. Zhang and J.D. Santos, *Microstructural characterization and in vitro apatite formation in CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub>-MgO-Na<sub>2</sub>O glass-ceramics*. Journal of European Ceramic Society, 2001. **21**: p. 169-175.
118. E. Jallot, *Role of magnesium during spontaneous formation of a calcium phosphate layer at the periphery of a bioactive glass coating doped with MgO*. Applied surface Science, 2003. **211**: p. 89-95.
119. A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, A. Ripamonti, M. Gazzano, and N. Roveri, *Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1993. **49**(1): p. 69-78.
120. C. Leonelli, G. Lusvardi, and L. Menabue, *Preliminary Experiments of In Situ Atomic Force Microscopy: Observation of Hydroxyapatite Formation on Bioactive Glass Surface*. J. Am. Ceram. Soc., 2001. **85**(2): p. 487-89.